

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001-181197

(P2001-181197A)

(43)公開日 平成13年7月3日(2001.7.3)

(51)Int.Cl.⁷
A 61 K 35/78
7/00
7/48
A 61 P 17/16
35/00

識別記号

F I
A 61 K 35/78
7/00
7/48
A 61 P 17/16
35/00

テ-マコ-ト⁷(参考)
C 4 C 0 8 3
K 4 C 0 8 8

審査請求 未請求 請求項の数18 O L (全28頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000-297931(P2000-297931)
(22)出願日 平成12年9月29日(2000.9.29)
(31)優先権主張番号 特願平11-293038
(32)優先日 平成11年10月14日(1999.10.14)
(33)優先権主張国 日本(JP)
(31)優先権主張番号 特願平11-293039
(32)優先日 平成11年10月14日(1999.10.14)
(33)優先権主張国 日本(JP)
(31)優先権主張番号 特願平11-293040
(32)優先日 平成11年10月14日(1999.10.14)
(33)優先権主張国 日本(JP)

(71)出願人 000227009
日清製油株式会社
東京都中央区新川1丁目23番1号
(72)発明者 久野 邦康
神奈川県横須賀市小矢部2-21-22-208
(72)発明者 松本 美保
神奈川県逗子市新宿1-6-36
Fターム(参考) 4C083 AA082 AA111 AA112 AC072
AC392 AC422 AD512 CC05
EE16
4C088 AB64 AC01 AC04 BA08 MA28
MA63 ZA89 ZB26

(54)【発明の名称】オリーブ抽出物

(57)【要約】

【課題】 本発明は、強い活性酸素除去機能や、優れたメラニン生成抑制機能、強力な腫瘍細胞増殖抑制・死滅機能を有し、かつ、安定で、人体に対する安全性が高く、用途の広い、新規の天然の抽出物を提供することを目的とする。

【解決手段】 オリーブ植物から得られる抽出物に関し、好ましくはオリーブ植物の実および/または種子から得られる抽出物に関する。該抽出物は様々な機能を有するが、特に活性酸素除去機能、メラニン生成抑制機能、腫瘍細胞増殖抑制・死滅機能の1または2以上の機能を有する。オリーブ植物から水および/または有機溶媒で抽出することで得ることができ、濃縮処理および/または分画・精製処理することで前記各機能を向上させることができる。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 オリーブ植物から得られる抽出物。

【請求項2】 オリーブ植物の実および／または種子から得られる抽出物。

【請求項3】 脱脂されたオリーブ植物の実および／または種子から得られる抽出物。

【請求項4】 オリーブ油製造工程で生じる生成物である、圧搾残渣、抽出残渣、圧搾油、抽出油、脱ガム油滓、脱酸油滓、ダーク油、脱色剤、脱臭スカム、搾油ジュース、排水、廃過材から選ばれる1種または2種以上から得られる抽出物。

【請求項5】 活性酸素除去機能、メラニン生成抑制機能、腫瘍細胞増殖抑制・死滅機能の1または2以上の機能を有する請求項1～4のいずれか1項に記載の抽出物。

【請求項6】 メラニン生成抑制機能指数が0.5以上および／または実質メラニン生成抑制機能指数が1以上である請求項1～5のいずれか1項に記載の抽出物。

【請求項7】 抗酸化効果、美肌効果、抗腫瘍効果の1または2以上の効果を有する請求項1～6のいずれか1項に記載の抽出物。

【請求項8】 水および／または有機溶媒で抽出することを特徴とする請求項1～7のいずれか1項に記載の抽出物の製造方法。

【請求項9】 有機溶媒が親水性有機溶媒である請求項8に記載の抽出物の製造方法。

【請求項10】 親水性有機溶媒がアルコールである請求項9に記載の抽出物の製造方法。

【請求項11】 更に濃縮処理および／または分画・精製処理することを特徴とする請求項8～10のいずれか1項に記載の抽出物の製造方法。

【請求項12】 濃縮処理が、水および／または有機溶媒に対する溶解性を利用した可溶分回収処理および／または不溶分回収処理、水一疎水性有機溶媒での液々分配処理、再結晶処理、再沈殿処理、冷却により生じた析出物を回収する処理から選ばれる1種または2種以上の処理である請求項11に記載の抽出物の製造方法。

【請求項13】 分画・精製処理が、再結晶、再沈殿、順相および／または逆相クロマトグラフィーによる精製、脱色処理、脱臭処理から選ばれる1種または2種以上である請求項11に記載の抽出物の製造方法。

【請求項14】 単位原料から得られるスーパーオキシド消去活性吸量指数が1.0以上である請求項8～13のいずれか1項に記載の抽出物の製造方法。

【請求項15】 メラニン生成抑制機能吸量指数および実質メラニン生成抑制機能吸量指数が5以上である請求項8～13のいずれか1項に記載の抽出物の製造方法。

【請求項16】 請求項1～8のいずれか1項に記載の抽出物を有効成分とする活性酸素除去剤。

【請求項17】 請求項1～8のいずれか1項に記載の

50

2

抽出物を有効成分とするメラニン生成抑制剤。
【請求項18】 請求項1～8のいずれか1項に記載の抽出物を有効成分とする腫瘍細胞増殖抑制・死滅剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、オリーブ(Olea europaea L.)を原料として抽出される抽出物に関し、特にスーパーオキシドやヒドロキシラジカル等の活性酸素種を消去するのに有効な強い活性酸素除去機能の他、優れたメラニン生成抑制機能、強力な腫瘍細胞増殖抑制・死滅機能を有する抽出物に関するものであり、また、これらの製造方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】油脂、とりわけ不飽和脂肪酸を含む油脂は酸化されやすく、品質劣化、栄養性・機能性低下の大きな原因となる。不飽和脂肪酸の中でもリノール酸、リノレン酸およびアラキドン酸は必須脂肪酸として栄養素として重要な役割を果たしている。また近年、EPA、DHAなど高度不飽和脂肪酸の生理活性に注目され、これらを含む多くの飲食物などが上市されている。しかしこれらの不飽和脂肪酸は極めて酸化安定性に欠けるため、抗酸化剤の添加が必要となるが、長期間保存に有効な抗酸化剤は今のところ無いのが現状である。

【0003】生物は、酸素を利用することによって生存に必要なエネルギーを効率的に得ている。しかしながら、このようなエネルギー代謝のうち酸素が水に変換される過程で、中間体として活性酸素種が生じる。一般にこの活性酸素種としては、マクロファージの刺激などによって放出されるスーパーオキシド、放射線の被爆などによって生成されるヒドロキシラジカルなどが知られている。これらの活性酸素種は過度の放射線や紫外線の照射、化学物質やタバコの摂取等の外的誘因と虚血再還流、炎症、ストレス、老化等の内的要因が原因となって生成される。このようにして生体内で過剰に生成された活性酸素種は、一般に化学的反応性が高く、生体内で隣接する脂質や核酸、蛋白質等の成分と容易に反応し、さまざまな疾病に繋がる酸化的障害をもたらす。活性酸素種の一例であるスーパーオキシドは、さまざまな疾病と深い関わりがあることが明らかにされており、例えば動脈中のLDLは、スーパーオキシドによって酸化されて泡沫細胞を形成し、動脈硬化の原因を発生する。また放射線の照射によりもたらされるヒドロキシラジカルの產生は、発癌などの深刻な障害を生体に与える。(Halliwell B. and Gutteridge M. C., Biochem. J. 219, 1-14, (1984))。

【0004】このような活性酸素種の生体に対する毒性が明らかになるにつれ、これらを効率的に消去する活性を有する活性酸素種消去物質等の抗酸化剤は、生体内または食品や医薬品、農薬等に含まれる成分の酸化的劣化

の防御剤として有用であり、食品産業、特に水産加工品、健康食品、栄養食品のほか、医薬品・農薬分野や化粧品分野において実利的な利用が期待されているものである。

【0005】近年、抗酸化剤に限らず、化学合成品からなる食品添加物の安全性の問題に対する消費者の意識の高まっており、例えば、BHA（ブチルヒドロキシルアニソール）やBHT（ブチルヒドロキシトルエン）等の化学合成抗酸化剤は、その使用が避けられる傾向にある。また、他の抗酸化剤も、植物由来のトコフェロール類など油溶性（非水溶性）のものが多く、実際の使用に際しては制約を受けることが多い。

【0006】このような中、これまでさまざまな抗酸化剤が、主に天然物由来の原料から抽出され、その応用が検討されている。例えばスーパーオキシド消去活性を有するものとして酵素蛋白であるスーパーオキシドジスムターゼ（SOD）等が、ヒドロキシラジカル消去活性を有するものとしてマンニトール、トリプトファン、ギ酸等が挙げられている（例えば、大柳善彦「SODと活性酸素種調節剤—その薬理的作用と臨床応用」、第224～228頁、日本医学館、1989年）。

【0007】しかしながら、SODは酵素タンパクであるため、熱などに対する安定性が乏しく、また経口投与した場合、投与した酵素のほとんどは消化・排泄されてしまい、その実効力は極めて低かった。また、ヒドロキシラジカルを効率的に消去できる実用的なヒドロキシラジカル消去剤は現在のところ少ない。従って、これら抗酸化剤を工業的に多量に、かつ安定に入手することは困難なのが現状である。また、通常、前述のSODはスーパーオキシドに対してのみ消去効果を有し、ヒドロキシラジカルに対しては全く効果がない。同様にマンニトールはスーパーオキシドを消去することができない。

【0008】消費者からの要望が強い、天然物由来で抗酸化効果を有する原料としては、例えば、ゴマ種子中の水溶性の抗酸化成分として、ゴマ脱脂粕等から得られる水溶性抽出物が抗酸化活性を有することが知られている（特公昭61-26342号公報等）。また、この脱脂粕抽出物にはリグナン配糖体類が含まれることがよく知られており、そのリグナン配糖体類が強力なヒドロキシラジカル消去活性を有することが知られている（特開平8-208685号公報等）。しかし、このゴマ種子等に含まれるリグナン配糖体はスーパーオキシドに対する消去活性は強いものとはいえない。

【0009】このような中、1種類の活性酸素種に対する消去活性だけでなく、スーパーオキシドとヒドロキシラジカルなど、複数種類の活性酸素種に対する強力な消去活性を有する、天然物由来の有効成分の安定供給が望まれているにも関わらず、これまで工業的に実用化された例は少ない。しかも、両活性を有する有効成分の供給はほとんど無いといってよく、これらの安定的な供給が

期待されている。

【0010】一方、皮膚に対して、ハリ、ツヤを与え、シワやたるみの発生を防止する、いわゆる皮膚の老化防止を目的とする化粧料は種々のタイプの製品が提案されている。代表的なものとしては、多価アルコール類（グリセリン、ソルビトール等）、ヒアルロン酸、コラーゲン、エラスチン、天然保湿因子（Natural Moisturizing Factor；例えばアミノ酸、乳酸塩、ピロリドンカルボン酸ソーダ、尿素等）、細胞間脂質（スフィンゴ脂質、リン脂質、コレステロール等）、皮脂類似物質（オリーブ油、ホホバ油、スクワラン等）等の保湿成分を配合した化粧料、またビタミンA、ビタミンC、ビタミンEおよびその誘導体、ビタミンF（リノール酸）、ビタミンH（グルタチオン）等のビタミン類、ホルモン類、植物抽出物（グリチルリチン、β-カロチン等）、動物抽出物（プラセンタリキッド、ローヤルゼリー等）等の細胞賦活成分を配合した化粧料がある。また、皮膚のシミやシワを目立たなくするように、表面処理を施したチタン粉末やタルク粉末を配合した化粧料もこれに該当する。

【0011】一般的に皮膚の老化現象の目安となる皮膚のシワやたるみを形成する主な原因として、皮膚の真皮組織における構成成分の質的および量的変化が大きく影響を及ぼすといわれている。すなわち真皮組織には纖維性蛋白成分としてコラーゲン繊維と弾性繊維（エラスチン）の2種類のものが存在するが、これらが種々の外的または内因的要因によって蛋白質変性をおこし、これにともないそれらの弾性力が低下して結果的にシワやたるみが生じると考えられている。

【0012】この蛋白質変性をひきおこす要因の一つにコラーゲン繊維間の架橋結合がある。この架橋結合は、幼若期のうちはコラーゲン繊維としての強度を増すために重要であり、架橋酵素によって促進される。しかし、それが充分に成熟した後にも生体にとって必要とされない架橋がコラーゲン繊維間で非酵素的に生成される。現在、この生成段階において活性酸素が関与していることが知られている（広瀬統一、J. Soc. Cosmetic Chem. Japan、第26巻（No. 4）第289～294頁、1993年等）。

【0013】コラーゲンは纖維芽細胞において産出され、纖維芽細胞自らが産生する酵素によって分解する。この産出と分解のバランスによりコラーゲンの量は組織

内で適切に維持されていると考えられるが、皮膚の日光露出部いわゆる光加齢皮膚においては、その組織中のコラーゲン量が著しく減少することが知られている。これに関連して、岡田らは、活性酸素が纖維芽細胞に対して作用してそのコラーゲン産生能を低減させ、さらにそのコラーゲン分解能を促進させることを知見として得ており、活性酸素の影響により皮膚組成中のコラーゲン含量が減少することを示唆している（岡田 富雄、香粧会

誌、第17巻(No. 4)、第202~206頁、1993年)。

【0014】さらに、前記繊維性成分の間は組織間基質つまりムコ多糖類(主にヒアルロン酸)で埋められているが、活性酸素が作用するとムコ多糖類の断片化(低分子化)現象が生じることが知られている(柏村直樹著、「活性酸素」、第464~468頁、共立出版、1990年)。

【0015】なほ、活性酸素にはスーパーオキシド(O₂-)、一重項酸素(1O₂)、ヒドロキシラジカル(-OH)、過酸化水素(H₂O₂)等があるが、このうちヒドロキシラジカルは反応性が高く、生物障害作用が最も大きいと考えられている。これに関連して田中らは、コラーゲンとグルコースとがマイラード反応を起こし、コラーゲンが架橋を生じる実験系を用い、これに種々の活性酸素の消去剤を添加し、コラーゲン架橋の抑制効果を調べている。その結果、スーパーオキシドおよび一重項酸素の消去剤には該効果がなく、ヒドロキシラジカル消去剤にコラーゲン架橋抑制効果のあることを認めている。また同時に、種々の活性酸素を用いてヒアルロン酸の断片化に及ぼす影響を調べた結果、ヒドロキシラジカルが最も作用することを認めている。(田中弘ら、香粧会誌、第17巻(No. 4)、第207~213頁、1993年)

【0016】活性酸素が生体内成分の酸化や生体の老化の要因の一つとして深く関わっていることはよく知られており、皮膚においても他臓器と同様に、活性酸素の影響を受ける。皮膚は常に外界と接しており、常に強い酸化ストレスに曝されている部位である。そのため、皮膚はこの不断の酸化ストレスに対し、各種の防御機構を具備している。例えば、角層は紫外線を反射、吸収、散乱する物理的光防御を果しており、また表皮には、産生された活性酸素を消去するために、スーパーオキシドシムターゼ(SOD)に代表されるような、各種の生体内抗酸化物質が存在する。例えば、アミノ酸のひとつであるトリプトファンは、紫外線照射によりスーパーオキシドを発生することが知られているが、この生体内SODの作用により、不活性化される。このように通常の状態においては、各種の酸化反応の進行は未然に防がれているが、例えば過度の日焼け等、異常な酸化ストレスによってこの防御機構が破壊されると皮膚炎や色素増加、皮膚ガンなどの原因になる他、継続的な酸化ストレスにより皮膚の老化等の現象が引き起こされる。

【0017】以上に述べたように、活性酸素の発生を防止し、またこれを除去することが皮膚のシワやたるみの形成といった皮膚の老化防止に有効であると考えられる。しかしながら、ヒドロキシラジカル消去剤としては、マニトール、トリプトファン、チオ尿素、ギ酸、アルコール等が知られているにすぎず、また微量で実用的に効果のあるヒドロキシラジカル消去剤はほとんどな

く、これを工業的に大量かつ安定に入手することは困難であるのが現状である。

【0018】さらに、皮膚の色黒やシミ、ソバカスは、一般に日光の紫外線暴露による刺激、ホルモンの異常又は遺伝的要素等によってメラノサイトが活性化され、その結果メラノサイトにて合成されたメラニン色素が皮膚内に異常沈着することにより発生する。このようなメラニン色素の異常沈着を改善あるいは防止することを目的として、L-アスコルビン酸もしくはその誘導体、ハイドロキノン誘導体、グルタチオンやコロイドトイオウ等の美白剤の開発がこれまでなされてきた。しかしながら、これらの美白剤には微弱なメラニン生成抑制機能しかないものや、酸化されやすく不安定なもの、さらに特有の異臭や沈殿が生じるものがあるといった問題があり、それぞれ単独で化粧料に配合した場合、皮膚に対する美白効果が必ずしも十分とはいえないかった。従って、効果が高く、安全かつ安定で肌の色黒、シミ、ソバカス、くすみを改善あるいは防止できる皮膚に対する美白効果を有する美白剤の開発が現在求められている。

【0019】近年のガン死亡率をみると、日本(1997年)においては上昇基調が続いている、また米国(1995年)においてはようやく下降基調に転じてきたものの死亡原因としては依然として第2位を占めている。これに対して、近年の多大な研究努力により、ガンの発生について分子機構レベルでの解明がなされてきている。これらの成果から、様々な化学物質が、ガンの発生過程の諸段階を制御しうることが示されており、抗腫瘍作用を有する薬剤として使用されている。これらの抗腫瘍剤はそれぞれ異なるメカニズムで効果を発揮するので、上手く組み合わせることでより効果的な治療が可能になる。また、一定の薬剤の使用により薬剤耐性が惹起されることも指摘されている。これらを鑑みると、多種多様な抗腫瘍剤が存在することが望ましい。さらに、これまでに様々な化学物質が抗腫瘍作用を有する薬剤として使用されているが、これらは抗腫瘍作用が強い反面、腫瘍細胞のみならず、正常細胞にも毒性を発揮するという副作用も有している。のことから、より細胞毒性が低く、安全性が高い抗腫瘍剤が望まれるのは明らかである。

【0020】一方、古来から食経験豊かな植物の一つにモクセイ科、オリーブ属のオリーブ植物がある。オリーブは古くから栽培されてきた植物で、現在では地中海沿岸が代表的な栽培地域である。用途としては、特にオリーブ油として重宝されており、欧洲はもちろん、日本や米国を始めとする世界各国で用いられている。オリーブ油は様々な効果を有することが知られており、古来から経験的に薬用あるいは化粧用としても用いられてきた。また、オリーブの実はそのまま食用にも用いられ、場合によっては、保存食として塩蔵されたりしている。のことから、オリーブは、安定的に入手可能で、また人体

にとって安全性の高い植物材料であるといえる。しかしながら、オリーブ油を搾油した際に残るオリーブ油粕は、肥料や燃料用として用いられているに過ぎなかった。

【0021】近年、オリーブ油に関しては、比較的酸化されにくい植物油であることが知られており、その中に含まれる微量成分のポリフェノール類が注目され、その生理的作用等について多くの研究がなされている（例えば、International Olive Oil Council, New Food Industry, Vol. 34, No. 4, 28-52, 199

2）。しかしながら、オリーブに関してはオリーブ油以外についてはあまり知られておらず、特にオリーブ植物中の抽出成分が強い活性酸素除去機能、優れたメラニン生成抑制機能、強力な腫瘍細胞増殖抑制・死滅機能を有することは、これまで、全く知られていなかった。

【0022】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、強い活性酸素除去機能や、優れたメラニン生成抑制機能、強力な腫瘍細胞増殖抑制・死滅機能を有し、かつ、安定で、人体に対する安全性が高く、用途の広い、新規の天然の抽出物を提供することを目的とする。

【0023】

【解決しようとする手段】本発明者らは、前記目的を達成するため鋭意検討した結果、オリーブ植物から得られる抽出物が強力な活性酸素除去機能、特にスーパーオキシドやヒドロキシラジカルを効果的に消去し得る活性酸素除去機能を有すること、また、非常に優れたメラニン生成抑制機能、強力な腫瘍細胞増殖抑制・死滅機能を有することを見いだし、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は、オリーブ植物から得られる抽出物に関し、また、オリーブ植物の実および／または種子から得られる抽出物に関し、更には、脱脂されたオリーブ植物の実および／または種子から得られる抽出物に関する。

また、オリーブ油製造工程中で生じる生成物である、圧搾残渣、抽出残渣、圧搾油、抽出油、脱ガム油滓、脱酸油滓、ダーク油、廃脱色剤、脱臭スカム、搾油ジュース、排水、廃過材から選ばれる1種または2種以上から得られる抽出物に関する。該抽出物は活性酸素除去機能、メラニン生成抑制機能、腫瘍細胞増殖抑制・死滅機能の1または2以上の機能を有する。さらにメラニン生成抑制機能に関しては、メラニン生成抑制機能指数が

0.5以上および／または実質メラニン生成抑制機能指数が1以上である抽出物が好ましい。本発明の抽出物は上記の様な活性酸素除去機能、メラニン生成抑制機能、腫瘍細胞増殖抑制・死滅機能等の1次的な機能を有するが、これらの機能を有する抽出物を人体やその他飲食物、医薬品、肥料、飼料や皮膚外用剤等に使用することで、様々な2次的な効果を得ることができる。例えば、抗酸化効果、美肌効果、抗腫瘍効果等であり、本発明は

抗酸化効果、美肌効果、抗腫瘍効果の1または2以上の効果を有する抽出物に関する。本発明の抽出物は、オリーブ植物を水および／または有機溶媒で抽出することで得ることができる。ここで、有機溶媒が親水性有機溶媒である場合が好ましく、また、親水性有機溶媒がアルコールである場合が好ましい。更に濃縮処理および／または分画・精製処理することで、各機能および効果を向上させることができ、また、人体やその他飲食物、医薬品、肥料、飼料や皮膚外用剤等に使用しやすいうようにすることができる。ここで濃縮処理は、水および／または有機溶媒に対する溶解性を利用した可溶分回収処理および／または不溶分回収処理、水-疎水性有機溶媒での液々分配処理、再結晶処理、再沈殿処理、冷却により生じた析出物を回収する処理から選ばれる1種または2種以上の処理である場合が好ましく、また、分画・精製処理は、再結晶、再沈殿、順相および／または逆相クロマトグラフィーによる精製、脱色処理、脱臭処理から選ばれる1種または2種以上である場合が好ましい。活性酸素除去機能の一つであるスーパーオキシド消去活性から見た場合、単位原料から得られるスーパーオキシド消去活性収量指数が100以上である抽出物の製造方法が好ましく、同様に、メラニン生成抑制機能から見た場合、メラニン生成抑制機能収量指数および実質メラニン生成抑制機能収量指数が5以上である製造方法が好ましい。更には、本発明は、前記抽出物を有効成分とする各種製剤に関し、特に、活性酸素除去剤、メラニン生成抑制剤、腫瘍細胞増殖抑制・死滅剤に関する。

【0024】

【実施の形態】以下に、本発明について詳細に説明する。本発明は、オリーブ植物の、主に実または種子、さらに、果皮、種皮、葉、茎、芽等から、また、これらの乾燥物、粉碎物、脱脂されたものから得られる抽出物に関し、該抽出物は強い活性酸素除去機能、特にスーパーオキシドやヒドロキシラジカルを同時に効果的に消去し得る活性酸素除去機能を有すること、非常に優れたメラニン生成抑制機能を有すること、さらに、強い腫瘍細胞増殖抑制・死滅機能を有すること、等の様々な機能を有する。本発明の抽出物は、オリーブ植物から得られるが、特にオリーブ植物の実および／または種子から好適に得ることができ、また、脱脂されたオリーブ植物の実および／または種子から得られる抽出物は余計な油分等を除去する必要がないため好ましい。また、オリーブ植物には、オリーブ油の製造工程において生じる生成物、例えば圧搾残渣、抽出残渣、圧搾油、抽出油、脱ガム油滓、脱酸油滓、ダーク油、廃脱色剤、脱臭スカム、搾油ジュース、排水、廃過材を含むものとする。上記オリーブ植物等から水および／または有機溶媒で抽出処理することで本発明の抽出物を製造することができる。好ましくは有機溶媒が親水性有機溶媒であり、さらには親水性有機溶媒がアルコールである場合、好適に抽出物を製

造することができる。該抽出物は様々な機能を有するが、特に活性酸素除去機能、メラニン生成抑制機能、腫瘍細胞増殖抑制・死滅機能等を有する。活性酸素除去機能とは、活性酸素種の生成を抑制、捕捉、消去、不均化、分解等する機能であり、特にスーパーオキシド消去活性やヒドロキシラジカル消去活性等に関する。メラニン生成抑制機能とは、紫外線暴露、ホルモン異常、遺伝情報等の刺激を受けたメラノサイトによるメラニン色素の生合成を抑制する機能であり、腫瘍細胞増殖抑制・死滅機能とは腫瘍細胞の増殖を抑制し、また、更には腫瘍細胞を死滅させる機能である。本発明の抽出物は活性酸素除去機能を有するが、特にスーパーオキシド消去活性、ヒドロキシラジカル消去活性等に優れている。また、本発明で得られる抽出物は、強いメラニン生成抑制機能を有する。例えば、優れたメラニン生成抑制機能を有する美白効果が強い美白剤として公知のアルブチンと比較しても同等以上のメラニン生成抑制機能を有する。アルブチンをポジティブコントロールとした時のメラニン生成抑制機能指数（アルブチンのメラニン生成抑制機能と比較した相対指数）で表わすと、本発明の抽出物のメラニン生成抑制機能指数は粗抽出レベルでも0.5～5程度であり、更に濃縮処理および／または分画・精製処理した場合には10～50程度であり、メラニン生成抑制機能が非常に強いものであることがわかる。さらに、本抽出物は、アルブチンに比べ、同等のメラニン生成抑制機能を発揮する濃度でのB-16メラノーマ細胞に対する毒性が非常に低いことから、皮膚への毒性が低いと考えられる。つまり、本発明の抽出物は、皮膚への悪影響が少なく安全であるといえる。以上のように、アルブチン等に比べ細胞への毒性が低いため、例えばそれらの既存の美白剤よりも多量に皮膚へ塗布することも可能である。よって、実際に皮膚へ使用した場合に与えることが可能な美白効果はアルブチン等に比べても更に高い。メラニン生成抑制機能と実際に皮膚に塗布できる量を勘案した実質メラニン生成抑制機能指数も、アルブチンと比較した場合、粗抽出レベルでも1～10程度であり、更に濃縮処理および／または分画・精製処理した場合には10～50程度であり、実際に皮膚へ使用した場合に与えられる美白効果は高い。またこれは、化粧料等へ高濃度で配合することができるということでもあるので、本発明の抽出物を配合した化粧料等は、皮膚に対する美白効果が強い。また、本発明で得られる抽出物は、腫瘍細胞増殖抑制・死滅機能を有する。少量で優れた腫瘍細胞増殖抑制・死滅機能を示すことから、本発明の抽出物を配合した医薬品等では、腫瘍細胞が発生した直後にその腫瘍細胞の増殖を抑制し、死滅させること、つまり腫瘍の進行を止め、腫瘍を消滅させる予防および／または治療効果が期待できる。本発明の抽出物は、さらに濃縮処理および／または分画・精製処理されることで各機能等が向上することから、該濃縮処理および／または

分画・精製処理がなされることが好ましい。濃縮処理としては、水および／または有機溶媒に対する溶解性を利用した可溶分回収処理および／または不溶分回収処理、水一疎水性有機溶媒での液々分配処理、再結晶処理、再沈殿処理、冷却により生じた析出物を回収する処理等を行うことができ、分画・精製処理としては、再結晶、再沈殿、順相および／または逆相クロマトグラフィーによる精製、脱色処理、脱臭処理等を行うことができる。例えば、水への溶解性を利用する方法で得られた比較的難水溶性等の成分は、抽出物の数倍のメラニン生成抑制機能を有し、例えばメラニン生成抑制機能指数をアルブチンと比べると8～20と非常に高く、皮膚に使用した場合に優れた美白効果を有するものとなる。また、分画・精製処理としてさらに各機能を向上させる処理をすることができる、また、脱色・脱臭等の処理をして無色、無臭にすることにより使用性を向上させることもできる。この場合、色や臭いによる制限を受けることなく幅広い分野で、幅広い用途に使用することができるので好ましい。このように、濃縮および／または分画・精製処理を経て得られる抽出物は、各機能とも向上し、色や臭い等を同時に除去することができるため好ましい。抽出処理と濃縮処理および／または精製処理の組み合わせは特に制限はされない。本発明の抽出物は、オリーブ植物から得られる抽出物であるが、抽出物の量としては他の天然原料に比べて高い収率で得ることができる。例えばゴマを用いた場合に比べて1～10倍の収率で得ることができる。本発明によれば活性酸素除去機能の強い抽出物を得ることができ、さらに、その単位原料あたりの収率も高い。この双方のことから、本発明の抽出物は、活性酸素除去機能の強さに、単位原料あたりの収率を乗じた活性酸素除去機能収量指数について、他の天然原料を用いた場合に比べて、大幅に高い値が得られる。スーパーオキシド消去活性に関していえば、単位原料から得られる抽出物のスーパーオキシド消去活性収量指数が100以上、およそ100～325程度であり、例えば、ゴマと比較した場合、1～650倍という高い値である。本発明によれば、強い活性酸素除去機能を有する抽出物を収率良く得ることができる。また、メラニン生成抑制機能の面からは、アルブチンを基準としたメラニン生成抑制機能指数が0.5以上であるものが好ましく、細胞毒性を考慮に入れた実質メラニン生成抑制機能指数が1以上であるものが好ましい。濃縮処理や、分画・精製処理することで、メラニン生成抑制機能指数では5以上に向上させることができ、皮膚に対する美白効果が非常に高い抽出物を得ることができる。本発明によれば、非常に強いメラニン生成抑制機能を有する抽出物を得ることができ、さらに、その単位原料あたりの収率も高い。この双方のことから、メラニン生成抑制機能の強さの指標として、本発明のメラニン生成抑制機能指数、実質メラニン生成抑制機能指数に単位原料あたりの収率を乗じたメ

ラニン生成抑制機能収量指数、実質メラニン生成抑制機能収量指数について、他の天然原料を用いた場合に比べて大幅に高い値が得られる。メラニン生成抑制機能収量指数および実質メラニン生成抑制機能収量指数が5以上である抽出物の製造方法が好ましい。また、本発明は該抽出物を有効成分とする各種製剤を得ることができ。特に該抽出物を有効成分とする活性酸素除去剤、メラニン生成抑制剤、腫瘍細胞増殖抑制・死滅剤を得ることができる。上記各製剤に含まれる抽出物は粗抽出物でも濃縮処理および／または分画・精製処理されたものでも用いることができるが、濃縮処理等された抽出物の方が各機能が向上されているため好ましい。更には、本発明の抽出物は上記の様な1次的な機能を有するが、これらの機能を有する抽出物を人体や各種製品に使用することで、様々な2次的な効果を得ることができる。例えば、抗酸化効果、美肌効果、抗腫瘍効果等である。具体的には、抗酸化効果としては製品の保存安定性向上効果等の酸化防止効果、各種疾病予防効果や抗老化効果等の生体内抗酸化効果等が得られ、美肌効果としては美白効果や皮膚の抗老化効果等が得られ、抗腫瘍効果としては腫瘍増殖・転移抑制効果等を得ることができる。本発明の抽出物は、各種機能・効果によって、様々な分野・用途に使用することができる。例えば、抗酸化効果を得ることを目的とすれば、例えば飲食料、皮膚外用剤、医薬品、飼料等に配合することができる。これによって生活習慣病等の各種疾病予防効果等の生体内抗酸化効果を有する飲食物を得ることができ、また、飲食物、皮膚外用剤、医薬品、飼料等の保存安定性の向上効果等の酸化防止効果が得られる。該抗酸化効果は主に活性酸素除去機能から得ることができるため、前記活性酸素除去剤を配合することでも効果を得ることができる。また、美肌効果を得ることを目的とすれば皮膚外用剤に配合することができる。皮膚のシワ・たるみの予防・改善等の皮膚の抗老化効果や、皮膚の色黒やシミ、ソバカス、くすみを改善あるいは防止する美白効果を有する、または、併せ持つ、肌を美しくする効果を有する皮膚外用剤を得ることができる。該美肌効果は、主にメラニン生成抑制機能と活性酸素除去機能から得られることから、メラニン生成抑制剤と活性酸素除去剤を配合することでも効果を得ることができる。さらには、抗腫瘍効果を得ることを目的とすれば、主に医薬品に配合することができる。腫瘍増加・転移抑制効果を有する医薬品を得ることができる。該抗腫瘍効果は主に腫瘍細胞増殖抑制・死滅機能から得られることから、前記腫瘍細胞増殖抑制・死滅剤を配合することでも効果を得ることができる。ここで、当該抽出物は、オリーブという植物由来のものであるので、人体および皮膚への安全性に優れ、かつ、一般的な植物であるので安定的な供給が可能である。

〔0025〕本発明の原料として用いるオリーブ植物 (*Olea europaea* L.) は、国産、欧州

産などの産地、食用あるいは搾油用を問わず使用できる。本発明の抽出物は、天然植物であるオリーブ植物の、主に実または種子から得ることができ、さらに、その果皮、葉、茎、芽から得ることができる。また、これらの乾燥物、粉碎物、脱脂物からも好適に得ることができます。また、上記オリーブ植物の果実やその脱脂物等に、添水する等により加水した場合、蒸気により蒸す等の加湿処理を行った場合、これらオリーブ植物の果実やその脱脂物等が適度に膨潤するので、抽出効率が良くなり好ましい。

〔0026〕特に、オリーブ植物の脱脂物からは、抽出物が非常に高い収率で得られ、かつ、得られた抽出物から油分を除去する必要がないため好ましい。また、オリーブ植物または当該脱脂物に含まれる脂質成分をベンタノン、ヘキサン、ヘプタン等の炭化水素、酢酸エチルエステル等の低級脂肪酸アルキルエステル、ジエチルエーテル等の公知の非水溶性の有機溶媒の1種又は2種以上で抽出除去し、更に必要に応じてこの洗浄処理を繰り返した脱脂物も利用できる。

〔0027〕オリーブ植物から水および／または有機溶媒で抽出することにより、本発明の抽出物を得ることができる。

〔0028〕オリーブ植物から本発明の抽出物を得るために用いる有機溶媒としては、親水性有機溶媒、疎水性有機溶媒のいずれでもよい。具体的には、親水性有機溶媒として、メチルアルコール、エチルアルコール、グリセリン、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール等のアルコール、アセトン、テトラヒドロフラン、アセトニトリル、1,4-ジオキサン、ビリジン、ジメチルスルホキシド、N,N-ジメチルホルムアミド、酢酸等の公知の有機溶媒が挙げられ、疎水性有機溶媒として、ヘキサン、シクロヘキサン、四塩化炭素、クロロホルム、ジクロロメタン、1,2-ジクロロエタン、ジエチルエーテル、酢酸エチル、ベンゼン、トルエン等の公知の有機溶媒が挙げられる。また、これらの有機溶媒は1種または2種以上を組み合わせて使用することができる。

〔0029〕工業的には、例えば植物組織への浸透性、抽出効率等からは、水および／または親水性有機溶媒を用いることが好ましく、また含水親水性有機溶媒を用いることが好ましい。具体的にはメチルアルコール、エチルアルコール、グリセリン、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール等のアルコール、アセトン、テトラヒドロフラン、アセトニトリル等の有機溶媒およびこれらの含水溶媒が挙げられる。これらの中から選ばれる、1種または2種以上により、オリーブ植物から、本発明の抽出物を得ることができる。

〔0030〕各機能を有する抽出成分の溶解性についての特性を利用すると、活性酸素除去機能を有する抽出物を得るには、水および／または親水性有機溶媒、好まし

くは含水親水性有機溶媒、さらには含水率の高い含水親水性有機溶媒を用いた抽出が好ましい。また、メラニン生成抑制機能、腫瘍細胞増殖抑制・死滅機能を有する抽出物を得るには、水および／または親水性有機溶媒、好ましくは含水親水性有機溶媒、さらには含有機溶媒率の高い含水親水性有機溶媒を用いた抽出が好ましい。また、疎水性の有機溶媒を用いても良く、特定の溶媒の組み合わせにより溶解性を向上させた溶媒を用いてよい。

【0031】抽出条件は、特に限定されないが、例えば、温度は5°C～95°C、好ましくは10°C～90°C、さらに好ましくは15°C～85°Cで、常温でも好適に抽出することができる。温度が高いほうが、抽出効率が高くなる傾向があり、特に50°C以上である場合が好ましい。圧力は、常圧でも、加圧でも、吸引等による減圧でも好適にことができる。また、抽出効率を向上させるため、振とう抽出や、攪拌機等のついた抽出機でも抽出することができる。抽出時間は、他の抽出条件によるが、数分～数時間であり、長時間など十分な抽出がなされるが、生産設備、収率等の生産条件によって適宜決めれば良い。また、抽出に使用する溶媒は、原料に対し1～100倍量（「質量／質量」。以下同様。）、好ましくは1～20倍量を使用することができる。

【0032】得られる抽出物の収率およびその後の回収方法を考慮すると、水および／または親水性有機溶媒を用いることが好ましく、また含水親水性有機溶媒を用いることが好ましい。また含水親水性有機溶媒での抽出処理する場合には、親水性有機溶媒含量が10質量%～95質量%である含水親水性有機溶媒で抽出するが好ましく、さらには親水性有機溶媒含量が20質量%～95質量%の含水親水性有機溶媒を使用することが好ましく、最も好ましくは親水性有機溶媒含量が30質量%～95質量%に調製された含水親水性有機溶媒であることが好ましい。

【0033】また、得られる抽出物が有する活性酸素除去機能の強さをも考慮に入れた場合、含水親水性有機溶媒での抽出において、親水性有機溶媒含量が10質量%以上である含水親水性有機溶媒で抽出するが好ましく、さらには親水性有機溶媒含量が40質量%以上の含水親水性有機溶媒を使用することが好ましく、最も好ましくは親水性有機溶媒含量が40質量%～80質量%に調製された含水親水性有機溶媒であることが好ましい。

【0034】また、得られる抽出物が有するメラニン生成抑制機能、腫瘍細胞増殖抑制・死滅機能の強さをも考慮に入れた場合、含水親水性有機溶媒での抽出において、親水性有機溶媒含量が10質量%以上含水親水性有機溶媒で抽出するが好ましく、さらには親水性有機溶媒含量が10質量%～95質量%の含水親水性有機溶媒を使用することが好ましく、最も好ましくは親水性有機溶媒含量が30質量%～95質量%に調製された含水

親水性有機溶媒であることが好ましい。

【0035】また、飲食料等への使用、皮膚への塗布を考えた場合の人体への安全性等を考えれば、特に、水および／またはアルコールのいずれかにより抽出することが好ましい。

【0036】得られる抽出物の収率およびその後の回収の面からは、水および／またはアルコールを用いることが好ましく、また含水アルコールを用いることが好ましい。また含水アルコールでの抽出処理する場合には、アルコール含量が10質量%～95質量%である含水アルコールで抽出するが好ましく、さらにはアルコール含量が20質量%～95質量%の含水アルコールを使用することが好ましく、最も好ましくはアルコール含量が30質量%～95質量%に調製された含水アルコールであることが好ましい。

【0037】また、得られる抽出物が有する活性酸素除去機能の強さをも考慮に入れた場合、アルコール含量が10質量%以上である含水アルコールで抽出するが好ましい。さらにはアルコール含量が40質量%以上の含水アルコールを使用することが好ましく、最も好ましくはアルコール含量が40質量%～80質量%に調節された含水アルコールが好ましい。

【0038】また、得られる抽出物が有するメラニン生成抑制機能、腫瘍細胞増殖抑制・死滅機能の強さをも考慮に入れた場合、アルコール含量が10質量%以上である含水アルコールで抽出するが好ましく、さらにはアルコール含量が10質量%～95質量%の含水アルコールを使用することが好ましく、最も好ましくはアルコール含量が30質量%～95質量%に調節された含水アルコールが好ましい。

【0039】ここで、本発明で使用するアルコールは、メチルアルコール、エチルアルコール、1-ブロバノール、1-ブタノール等の1級アルコール、2-ブロバノール、2-ブタノール等の2級アルコール、2-メチル-2-ブロバノール等の3級アルコールさらにエチレングリコール、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール等の液状多価アルコール等の公知の溶媒が挙げられ、これらの溶媒は1種または2種以上を組み合わせて使用することができる。

【0040】工業的には、生産コストの面、および、蒸留による溶媒除去等のハンドリングの面から見ても、特に低級アルコールを使用することが好ましい。ここで、低級アルコールとは、炭素数が1～4である公知のアルコール、例えば、前述の1、2、3級、もしくは、液状多価のアルコール等があげられ、これらの1種または2種以上を組み合わせて使用することができる。

【0041】その他、オリーブ油の製造工程において生じる生成物、例えば圧搾残渣、抽出残渣、圧搾油、抽出油、脱ガム油滓、脱酸油滓、ダーク油、廃脱色剤、脱臭スカム、搾油ジュース、排水、廃過濾材からも本発明の

活性酸素除去機能、メラニン生成抑制機能、腫瘍細胞増殖抑制・死滅機能を有する抽出物が得られる。オリーブの有効活用の面からも好ましい抽出物の製造方法である。ここで、オリーブ油の搾油工程で生じる排水からも本発明の抽出物が有する活性酸素除去機能に加え、メラニン生成抑制機能、腫瘍細胞増殖抑制・死滅機能を有する抽出物を得ることができる。特に、オリーブ油を搾油するに際し、オリーブ実を圧搾すると油分と水分を含んだジュースと呼ばれるものが得られ、これから水分を除去し、オリーブ油を得るが、この水相部分中に生じた析出物を回収することで好適に本発明のメラニン生成抑制機能、腫瘍細胞増殖抑制・死滅機能を有する抽出物が得られる。

【0042】このように、水および／または有機溶媒を用いた抽出により、活性酸素除去機能、メラニン生成抑制機能、腫瘍細胞増殖抑制・死滅機能を有する抽出液を製造できる。また、本発明の抽出物の水可溶性等の成分は、活性酸素除去機能が強く、より難水溶性および／または油溶性の抽出物では、メラニン生成抑制機能、腫瘍細胞増殖抑制・死滅機能が強い。

【0043】このようにして得られた抽出液から、溶媒、水分を除去することで、本発明の抽出物を乾固物として得ることができる。溶媒、水分の除去は減圧蒸留、減圧・真空乾燥、凍結乾燥、スプレードライ等の公知の方法で行うことができる。もちろん、溶媒、水分を含んだままでも良く、また、溶媒のみ除去して水溶液状のものを得ることもできる。さらに、溶媒、水分除去の程度を調整することで抽出物の濃度が調整された、つまり、活性酸素除去機能、メラニン生成抑制機能、腫瘍細胞増殖抑制・死滅機能の強さが調整された、活性酸素除去機能、メラニン生成抑制機能、腫瘍細胞増殖抑制・死滅機能を有する抽出液を調製することもできる。

【0044】また、本発明の製造方法によれば、原料単位あたり、活性酸素除去機能、メラニン生成抑制機能、腫瘍細胞増殖抑制・死滅機能等を有する抽出物を他の天然原料に比べても高い収率で、例えばゴマを用いた場合に比べて1～10倍の収率で得ることができる。

【0045】また、脱脂物からの抽出物は、トリグリセライド、ステロール、トコフェロール等の油溶性成分は含有していないので、これらを除去、精製する必要がないため、好ましい。

【0046】また、オリーブ油の製造工程において生じる生成物、例えば圧搾残渣、抽出残渣、圧搾油、抽出油、脱ガム油滓、脱酸油滓、ダーク油、廃脱色剤、脱臭スカム、搾油ジュース、排水、廃濾過材からも本発明の活性酸素除去機能、メラニン生成抑制機能、腫瘍細胞増殖抑制・死滅機能を有する抽出物が得られるので、オリーブの極めて優れた有効利用方法であり、生産コストの面から見ても優れた方法といえる。

【0047】これらの抽出物はそのまま用いても良い

が、必要によりさらに濃縮処理および／または分画・精製処理したものを用いることができる。

【0048】濃縮処理については、特に限定されないが、例えば濃縮処理が、水および／または有機溶媒に対する溶解性を利用した可溶分回収処理および／または不溶分回収処理、水-疎水性有機溶媒での液々分配処理、再結晶処理、再沈殿処理、冷却により生じた析出物を回収する処理から選ばれる1種または2種以上の処理により、好適に濃縮処理ができる。

【0049】例えば、水への溶解性を利用した濃縮方法を用いることによって、水に容易に溶ける成分、つまり水可溶性等の成分と、水に溶解しにくいおよび／または水に溶解しない成分、つまり難水溶性等の成分に分離することができる。ここで、水可溶性等の成分の濃縮物は、難水溶性等の成分に比べ、活性酸素除去機能が高い。一方、難水溶性等の成分の濃縮物は水可溶性等の成分の濃縮物に比べ、大幅にメラニン生成抑制機能、腫瘍細胞増殖抑制・死滅機能が高い。

【0050】また、濃縮方法の一つとして、オリーブ植物より得られた抽出液から、溶媒除去する過程において、濃縮物を容易に得ることができる。すなわち、溶媒のみを除去した水溶液において、水可溶分と水不溶分をろ過処理、遠心処理、デカンテーション処理等により分離し、それぞれを脱水・乾燥することで、強い活性酸素除去機能を有する水可溶性等の濃縮物と、強いメラニン生成抑制機能、腫瘍細胞増殖抑制・死滅機能を有する難水溶性等の濃縮物を別々に得ることができる。このように、1回の濃縮工程で活性酸素除去機能と、メラニン生成抑制機能および、腫瘍細胞増殖抑制・死滅機能が高い濃縮物を得られることから、効率面でも非常に優れた濃縮方法であるといえる。

【0052】また、オリーブ植物から抽出し乾固した抽出物に水を添加・攪拌することで、水に溶解しにくい成分および／または水に溶解しない成分、つまり難水溶性等の成分と水に容易に溶ける成分に分けることで、大幅に濃縮することができる。本発明の抽出物は活性酸素除去機能、メラニン生成抑制機能、腫瘍細胞増殖抑制・死滅機能を有する。ここで、抽出物中の水に容易に溶ける成分、つまり水可溶性等の成分と、水に溶解しにくいおよび／または水に溶解しない成分、つまり難水溶性等の成分に分離することができるが、水可溶性等の成分の濃縮物は、活性酸素除去機能が高く、一方、難水溶性等の成分の濃縮物は、大幅にメラニン生成抑制機能、腫瘍細胞増殖抑制・死滅機能が高い。オリーブ植物からの抽出物に含まれる水可溶性等の濃縮物は、オリーブ植物からの抽出物全体や、抽出物中の難水溶性等の成分と比べても、活性酸素除去機能が大幅に優れている。また、難水溶性等の成分は、オリーブ植物からの抽出物全体や、抽出物中の水可溶性等の濃縮物と比べても、メラニン生成抑制機能、腫瘍細胞増殖抑制・死滅機能が大幅に優れて

いる。

【0054】このように、水可溶性等の濃縮物、または、難水溶性等の濃縮物は、オリーブ植物からの抽出物を水に添加・攪拌した後、析出している部分をろ過等により採取することで簡易に得ることができる。また、水の量や温度を調整することで、得られる上記の水可溶性等の成分の成分の量と活性酸素除去機能の強さを調整することができ、または、難水溶性等の成分の量とメラニン生成抑制機能、腫瘍細胞増殖抑制・死滅機能の強さを調整することができる。

【0055】また、本発明の抽出物は、必要に応じて、一般的な溶剤の組合せによる液-液分配により濃縮することができる。溶剤の組合せは一概に規定し難いが、例えば、水-疎水性有機溶媒の組合せが挙げられ、疎水性有機溶媒としては、ヘキサン、四塩化炭素、クロロホルム、ジクロロメタン、1, 2-ジクロロエタン、ジエチルエーテル、酢酸エチル、n-ブタノール、ベンゼン、トルエン等の公知の有機溶媒が挙げられる。この液-液分配において、水相の水を除去することによって、活性酸素除去機能を有する濃縮物を得ることができ、一方、溶媒相の溶媒を除去することで、容易にメラニン生成抑制機能、腫瘍細胞増殖抑制・死滅機能を有する濃縮物を得ることができる。

【0056】さらに、本発明の抽出物、該抽出物を濃縮処理したものは、さらに分画・精製処理することができる。これにより上記濃縮以上に濃縮することができる。分画・精製処理することの利点としては、メラニン生成抑制機能等の各効果を非常に向上させることができることに加え、不純物を除去できること等が挙げられる。すなわち、該分画・精製処理した場合、皮膚外用剤等に余計な色をつけることなく好適に配合することができる等のメリットがあり、好ましい。

【0057】分画・精製処理の方法については特に制限されないが、例えば、順相および/または逆相クロマトグラフィーによる精製、再結晶、再沈殿、脱色処理、脱臭処理から選ばれる1種または2種以上の処理により好適に分画・精製処理することができる。特にクロマトグラフィーの中でも液体クロマトグラフィーを利用する方法は、本発明の抽出物、濃縮物を分解することなく、収率良く分画・精製出来るので、好ましい。液体クロマトグラフィーとしては、具体的に、順相液体クロマトグラフィー、逆相液体クロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー、ベーバークロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)等が挙げられるが、本発明の抽出物や濃縮物を分画・精製処理する際には、いずれの方法でも用いることができる。とりわけ、分離能、処理量、工程数等を考慮に入れると、順相液体クロマトグラフィー、逆相液体クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)が好ましい。

【0058】ここで、順相液体クロマトグラフィーと

は、例えば以下のような方法を指す。すなわち、例えばシリカゲルを固定相、ヘキサン-酢酸エチル混液、クロロホルム-メタノール混液等を移動相としたカラムを作成し、オリーブ植物からの抽出物あるいはその濃縮物を負荷率0.1~5% (wt(質量)/v(体積))で供し、単一移動相による連続的溶出法あるいは溶媒極性を順次増加させる段階的溶出法により、所定の画分を溶出させる方法である。逆相液体クロマトグラフィーとは、例えば以下のような方法を指す。すなわち、例えばオクタデシルシランを結合させたシリカ(ODS)を固定相、水-メタノール混液、水-アセトニトリル混液、水-アセトン混液等を移動相としたカラムを作成し、オリーブ植物からの抽出物あるいはその濃縮物を負荷率0.1~5% (wt(質量)/v(体積))で供し、单一溶媒による連続的溶出法あるいは溶媒極性を順次低下させる段階的溶出法により、所定の画分を溶出させる方法である。高速液体クロマトグラフィー(HPLC)とは、原理的には、上記順相液体クロマトグラフィーあるいは逆相液体クロマトグラフィーと同様のものであり、より

10 迅速かつ高分離能での分画・精製を行うためのものである。上記手法を1種または2種以上組合わせることで、非常に濃縮でき、かつ、不純物が除去された状態で得ることができるため好ましい。さらに、上記手法を1種または2種以上組合わせることで、各機能を得るために濃度を調整することができ、必要に応じた各機能の強さ、特性等を設計することもできる。

【0059】濃縮処理は繰返し濃縮処理しても良く、異なる濃縮処理を組合せても良い。同様に、分画・精製処理も繰返し分画・精製処理しても良く、異なる分画・精製処理を組合せても良い。更に、濃縮処理を行った後に分画・精製処理しても良く、分画・精製処理を行った後に分画・精製処理しても良く、濃縮処理した後に分画・精製処理を行い更に濃縮処理することもできる。当然、前述の組み合わせ以外の組み合わせでも良い。

【0060】また、オリーブ植物から得られる抽出物から、濃縮処理および/または分画・精製処理したもの、脱色および/または脱臭処理した場合、不要な成分が除去され、かつ、無色~淡色および/または無臭~無臭に近い状態になるので、色や、香りによる、使用の制限を受けないため、幅広い用途が確保できるため好ましい。脱色方法としては、活性炭処理や白土処理等があげられ、脱臭方法としては、同様に活性炭処理、白土処理があげられ、さらに超臨界抽出、水蒸気蒸留等が挙げられる。

【0061】また、オリーブ油の製造工程において生じる生成物、例えば圧搾残渣、抽出残渣、圧搾油、抽出油、脱ガム油滓、脱酸油滓、ダーク油、廃脱色剤、脱臭スカム、搾油ジュース、排水、廃過濾材からも本発明の活性酸素除去機能、メラニン生成抑制機能、腫瘍細胞増殖抑制・死滅機能を有する抽出物が得られるが、同様に

19

して濃縮、分画精製を行うことができる。

【0062】得られた抽出物、該抽出物を濃縮処理および／または精製処理したものは単独でも、これらを2種類以上組み合わせても使用することもできる。これにより、活性酸素除去機能、メラニン生成抑制機能、腫瘍細胞増殖抑制・死滅機能の強さの特性等を設計することができ、さらに好適な活性酸素除去機能、メラニン生成抑制機能、腫瘍細胞増殖抑制・死滅機能を有する抽出物として使用することができる。さらに、他の抗酸化剤、美白剤、抗癌剤を配合して使用することができ、これにより、各効果の強さ等の詳細な設計が可能であり、また、他の機能物質との相乗効果により大幅な機能強化も期待できる。また、各機能を組み合わせて用いることもできる。さらに、複数機能を有することから、様々に選択できる機能により、機能の設計をすることができる。

【0063】また、水に対する溶解特性を利用し、抽出物をその溶解特性ごとに分け、それぞれの特性を有效地に利用することができる製品に配合することもできる。本発明の抽出物の活性酸素除去機能を有する成分は特に水系の製品に好適に配合することができる。本発明の抽出物は水に容易に溶解する成分、水に溶解しにくい成分、水に溶解しない成分を含んでなるが、特に活性酸素除去機能を有する成分は水溶性成分であるので、水系の製品に好適に使用することができる。一般的な抗酸化剤は例えば植物油由来のトコフェロール類等、油溶性（非水溶性）のものが多く、実際の使用に際しては制約を受けることが多い中で、本発明の抽出物の活性酸素除去機能を有する成分は水溶性である（水溶性成分を含んでいる）ので応用範囲が非常に広く、本抽出物を使用した抗酸化剤は、汎用性の高い抗酸化剤と言える。本発明の抽出物は水系、あるいは、乳化系等、幅広い範囲の飲食料において好適に使用することができ、これを均一に溶解、ないしは分散させて含有させることができる。また、特に化粧料への使用に関しては、水系の化粧料へも使用できるため、広い用途・種類の化粧料へ使用することができるというメリットがある。

【0064】本発明の抽出物の難水溶性成分は、特にメラニン生成抑制機能、腫瘍細胞増殖抑制・死滅機能に優れていることが見出されている。難水溶性等の部分に関しては、経皮吸収性が良いため、皮膚へその効果を好適に与えることができるため好ましい。また、油系への使用は、特に単なる抽出物段階では、油に溶解しにくい成分、油に溶解しない成分が比較的多く含まれていること等の理由から、油脂等への好適な利用は、不溶分を除去する等の精製を行った抽出物を配合するか、また、水および乳化剤を配合することで乳化物として利用する方が好ましい。特に、活性酸素除去機能を付加したい場合には、上記のような処理を行うことが好ましい。

【0065】本発明の抽出物は、活性酸素除去機能、メラニン生成抑制機能、腫瘍細胞増殖抑制・死滅機能等を

20

有する。活性酸素除去機能とは、生体内または食品や医薬品、農薬等において、活性酸素種の生成を抑制、捕捉、消去、不均化、分解等する機能を示す。より具体的には、例えば、活性酸素種生成の原因となる金属イオンのキレート化および不活性化による活性酸素生成抑制、生成した活性酸素種の消去あるいは分解、酵素等による不均化、ラジカルの捕捉または安定化によるラジカル連鎖反応の抑制および遮断等が挙げられる。ここで、活性酸素種とは、主にスーパーオキシド、ヒドロキシラジカル、バーヒドロキシラジカル、過酸化水素、一重項酸素等を示し、さらには、脂質、蛋白質、炭水化物、核酸等の過酸化物およびこれらから派生するフリーラジカルをも含むものとする。これらの活性酸素種は、食品や生体内における脂質、蛋白質、炭水化物、核酸等の様々な成分を強力に酸化し、本来の成分とは異なる成分に変換または分解してしまう。したがってこの機能は、生体内または食品や医薬品、農薬等に含まれる成分の酸化的劣化の防御剤として有用であり、食品産業、特に水産加工品、健康食品、栄養食品のほか、医薬品・農薬分野や化粧品分野において実利的な利用が期待されるものである。本発明の抽出物は、これらの中でも、特に、高いスーパーオキシド消去活性およびヒドロキシラジカル消去活性を有する。また、このスーパーオキシド、ヒドロキシラジカルは生体内での酸化障害の他、様々に起こる酸化劣化の原因として、活性酸素種の中でも特に大きな影響を与えるものである。従って、本発明の抽出物はこれら2種の活性酸素を除去できることによって、優れた活性酸素除去機能を有し、さらに本抽出物を上記の様々な分野において実際に利用した場合、非常に高い効果を得ることができ。すなわち、各種疾病的予防効果や抗老化効果等の優れた生体内抗酸化効果や、様々な用途における製品の保存安定性向上等の優れた酸化防止効果が得られる。

【0066】スーパーオキシド消去活性とは、酸素分子の1電子還元により生成するスーパーオキシドを不均化、無効にする活性である。スーパーオキシドは、例えば生体内においては、白血球やミトコンドリア等で生成され、酸素を利用した生命活動においてその生成を免れることは出来ないものである。また、スーパーオキシドは、その反応性は比較的低く、鉄や一酸化窒素などの限られたものとしか反応しないが、過酸化水素の生成源になるなど他の活性酸素種の生成につながり、生体成分に酸化傷害を引き起す作用を有するため、生成後すぐに消去されるべき重要な活性酸素種である。スーパーオキシドジスマターゼ（SOD）はスーパーオキシド消去効果を有し、原核生物ですら保有している生体内酵素であるが、より積極的に生体成分を保護するためにはスーパーオキシド消去活性を有する物質を生体に適用することが望ましい。しかし、例えばこのSODは酵素蛋白であり安定性が乏しく、経口投与した場合では、殆どが排泄

されてしまうため実効力は極めて低い。すなわち、本発明の抽出物は、摂取あるいは皮膚等に塗布することで安定的にそのスーパーオキシド消去活性を享受できるものであるので、より効果的に生体成分を保護することで、健康な体を保つことあるいは肌を美しいものにすること等に大きく寄与するものである。

【0067】本発明の抽出物は抽出物レベルでありながら、代表的な抗酸化剤であるBHAを上回る強力なスーパーオキシド消去活性をしており、スーパーオキシド消去剤、脂質過酸化防止剤等の活性酸素除去剤として利用することができる。

【0068】ヒドロキシラジカル消去活性とは、種々の要因により生成したヒドロキシラジカルを捕捉、安定化させる活性である。ヒドロキシラジカルは、例えば酸素を利用した生命活動においては、その生成を免れることは出来ず、種々の活性酸素種の中でも非常に反応性に富む化学種であり、あらゆる生体成分を酸化損傷させ得る最も毒性の高い活性酸素種である。このヒドロキシラジカルの生成経路の一つとしては、生体内に存在する鉄イオンが過酸化水素やスーパーオキシドに関与するフェントン反応等が挙げられるが、生体内にはヒドロキシラジカルに対する有効な除去機構が存在しないため、ヒドロキシラジカル消去活性を有する物質の摂取は必要不可欠である。このヒドロキシラジカルの除去剤としては、マンニトールやトリプトファン、ギ酸等がある。しかしながら、これらのものの中には、単一品でありながらかなりの高濃度添加を要するものが多い。すなわち、本発明の抽出物は、摂取あるいは皮膚等に塗布することでそのヒドロキシラジカル消去活性を享受できるものであり、効果的に生体成分を保護することで健康な体を保つことあるいは肌を美しいものにすること等に大きく寄与するものである。

【0069】本発明の抽出物は、抽出物レベルとしては、かなり少量でヒドロキシラジカルを消去（例えば、リノール酸の過酸化を抑制）することが可能であり、通常のヒドロキシラジカルの除去剤と比べても非常に有効であるといえる。ヒドロキシラジカル消去剤、脂質過酸化防止剤等の活性酸素除去剤として使用できる。

【0070】しかも、前述のSODはスーパーオキシドに対してのみ消去活性を示し、ヒドロキシラジカルに対しては全く消去活性が無く、また、同様にマンニトールはスーパーオキシドを消去出来ない。これに対して、本抽出物はこの両者に対して、消去活性を示す。すなわち、本発明の抽出物は、強いスーパーオキシド消去活性、および、強いヒドロキシラジカル消去活性という両方の活性酸素除去機能を有するので、極めて汎用性が高いといえる。また、効果の面からは、スーパーオキシド消去活性、ヒドロキシラジカル消去活性の両方の活性酸素除去機能を有することから、生体内抗酸化効果を有するものとして優れており、併せて、ヒドロキシラジカル

消去活性による酸化防止効果を有することから飲食料、化粧料、医薬品、飼料等の保存安定性向上効果を有するものとして優れている。

【0080】皮膚の老化現象であるシワやたるみを引き起こす要因として、コラーゲン繊維の架橋重合の他、コラーゲン産生能の低下やコラーゲン分解能の促進等によるコラーゲン量の減少、組織間基質つまりムコ多糖類（主にヒアルロン酸）の断片化（低分子化）があるが、これら全てに活性酸素が関与していることがよく知られている。このような要因を引き起こす活性酸素種の中でも、最も反応性の高いのがヒドロキシラジカルであり、これがシワ、たるみに及ぼす影響も大きい。また、スーパーオキシドは、それ自身の反応性は比較的低いが、過酸化水素の生成源になり、ヒドロキシラジカル等、他の様々な活性酸素種の発生要因である。従って、それ自体の反応性は低いが、生体成分等、非常に多くの酸化傷害に関与する重要な活性酸素種である。このことから、ヒドロキシラジカル消去活性を有するということは、皮膚の老化現象を引き起こす要因であるヒドロキシラジカルという最強の活性酸素種を不活性化できることになる。さらに、スーパーオキシド消去活性をもつということは、ヒドロキシラジカルをはじめとする種々の活性酸素種の生成源であるスーパーオキシドを不活性化できることから、皮膚の老化の要因物質の発生を抑制し、老化現象を防ぐことにつながる。従って、本抽出物を利用した際の効果の面では、抽出物がスーパーオキシド消去活性、ヒドロキシラジカル消去活性の両活性を併せ持つことで、皮膚の老化の要因物質の発生を防ぎ、かつ、発生した老化の要因物質を不活性化することができるの

で、より一層皮膚への抗老化に寄与する。

【0081】他の天然抗酸化物と活性酸素除去機能を比較すると、例えば比較的活性酸素除去機能が強いとされるゴマ粕由来の抽出物のスーパーオキシド消去活性は5～10unit/（mg/mL）であるのに対し、本発明の抽出物はスーパーオキシド消去活性が20～65unit/（mg/mL）であり、ゴマ粕由来抽出物の2～13倍という、非常に高い活性を有する。

【0082】ここで、本発明によれば、活性酸素除去機能の強い抽出物を得ることができ、さらに、その単位原料あたりの収率も高い。この双方のことから、活性酸素除去機能の強さに、単位原料あたりの収率を乗じた活性酸素除去機能収量指數×式1>について、他の天然原料を用いた場合に比べて、大幅に高い値が得られる。つまり、単位原料あたりに得られる活性酸素除去機能の総量が大きいということである。よって、本抽出物を生産し、使用することで、活性酸素除去機能が強い製品はもちろん、他の天然の抗酸化剤等と置き換えた場合、単位原料から得られる活性酸素除去機能の総量が大きいためより多くの製品をつくることができる、ということであり、このことは、コスト面からのメリットも期待できる

ということである。また、この活性酸素除去機能収量指数を参考とすることで、好適な生産条件を決めることもできる。

【0083】

【数1】<式1> 活性酸素除去機能収量指数 = 活性酸素除去機能の強度 × 単位原料あたりの收率 (%)

【0084】スーパーオキシド消去活性に関していえば、単位原料から得られる抽出物のスーパーオキシド消去活性収量指数<式2>がおよそ100～3250である。例えば、ゴマと比較した場合、スーパーオキシド消去活性収量指数が5～100であるので、ゴマの場合の1～650倍という高い値である。つまり、同じ単位原料あたりで1～650倍の活性酸素除去機能が得られるということである。

【0085】

【数2】<式2> スーパーオキシド消去活性収量指数 = スーパーオキシド消去活性 ($\text{unit} / (\text{mg}/\text{mL})$) × 単位原料あたりの收率 (%)

【0086】本発明の抽出物は、強いメラニン生成抑制機能を有する。メラニン生成抑制機能とは、紫外線暴露、ホルモン異常、遺伝情報等の刺激を受けたメラノサイトによるメラニン色素の生合成を抑制する機能である。一般に、皮膚の色黒やシミ、ソバカス、くすみは、紫外線による刺激やホルモン異常等によってメラノサイトが刺激され、そこで生合成されたメラニン色素が皮膚に沈着して発生することが分かっている。したがって、メラニンの生成を抑えることが出来れば、皮膚の色黒やシミ、ソバカス、くすみを予防・改善することが可能である。すなわち、本発明の抽出物は、そのメラニン生成抑制機能を享受できるものであり、摂取することで体の内面から、皮膚等に塗布することで外面からその効果を発現させ、白く美しい肌を保つこと等に大きく寄与することができる。

【0087】本発明の抽出物について、次のようなメラニン生成抑制機能を指標として評価する。その方法としては、B-16メラノーマ細胞を用いた培養実験系にて、その細胞白色化度（メラニン生成抑制機能）と細胞毒性を比較評価する。

【0088】B-16メラノーマ細胞はメラニン產生能を有する細胞であり、培養により自然に増殖した細胞は黒色化する。この増殖中に系内にメラニン生成を抑制する物質が存在すると、細胞の黒色化が抑えられ相対的に白色化する。そこで、検体無添加時の黒色化度に対する検体添加時の細胞白色化度を比較評価する。また、物質によってはB-16メラノーマ細胞に対する毒性を有するものがある。この細胞毒性を評価するために、細胞生存率を検体無添加時と検体添加時で比較する。この細胞白色化度と細胞生存率を併せて、メラニン生成抑制機能を評価する。

【0089】B-16メラノーマ細胞を用いた細胞培養 50

系でのメラニン生成抑制機能の評価方法の実例としては、6穴プレートに培地を2ml/well取り、B-16メラノーマ細胞を所定量播種し、37°C、二酸化炭素濃度5%にて静置、培養する。翌日、所定濃度になるよう検体試料（オリーブ各種抽出物）調製液を添加混和し、培養を継続する。培養5日目に培地を交換し、再度検体試料調製液を添加する。翌日、培地を除き、細胞を回収しPBS（リン酸緩衝生理食塩水）で洗浄後、細胞の白色化度により評価した。なお、メラニン生成抑制機能の評価は、検体試料調製液の代わりにアルブチン（ポジティブコントロール） $300 \mu\text{g}/\text{mL}$ を用いて同様の操作を行った細胞の白色化度、および、検体試料無添加（コントロール）で同様にして得られた白色化度と比較して評価する。

【0090】本発明の抽出物は抽出物レベルでありながら、優れたメラニン生成抑制機能を有する美白効果の強い美白剤のアルブチンやコウジ酸と比較して、同等以上のメラニン生成抑制機能を有し、さらに、ビタミンCリノ酸マグネシウムを大幅に上回る、非常に強いメラニン生成抑制機能を有する。アルブチンをポジティブコントロールとした時の、下記<式3>により求められるメラニン生成抑制機能指数で表わすと、本発明の粗抽出物はメラニン生成抑制機能指数が0.5～5程度であり、抽出物レベルであるにもかかわらず非常にメラニン生成抑制機能が高い。更に濃縮や分画・精製を行えば、さらに向上し、メラニン生成抑制機能指数も高いものとなり、例えば水への溶解性を利用して濃縮された抽出物はメラニン生成抑制機能指数が8～20程度まで向上している。

【0091】

【数3】<式3> メラニン生成抑制機能指数 = A ÷ B
A : ポジティブコントロールの濃度（アルブチン300 ppm）

B : ポジティブコントロール（アルブチン300 ppm）添加時と同じ白色化度を発現する検体試料の濃度 (ppm)

【0092】本発明の抽出物は、B-16メラノーマ細胞に対する優れたメラニン生成抑制機能を有するのみならず、B-16メラノーマ細胞に対する細胞毒性も非常に低いことから、皮膚への毒性が低いと考えられる。

【0093】例えば、B-16メラノーマ細胞に対する細胞毒性を、美白剤として広く用いられているアルブチンをポジティブコントロールとした時の、下記<式4>により求められる細胞への毒性指数で表わすと、本発明の抽出物は細胞への毒性指数が低く、アルブチンと比較して皮膚に対する毒性が低い。

【0094】

【数4】<式4> 細胞への毒性指数 = C ÷ D
C : B-16メラノーマ細胞の生存率が10%以下になるポジティブコントロールの濃度（アルブチン500 ppm）

p m)

D : B-16メラノーマ細胞の生存率が10%以下になる検体試料の濃度

【0095】ここで細胞生存率は、下記<式5>より求めます。

【0096】

$$[数5] <式5> \text{細胞生存率} (\%) = (E \div F) \times 100$$

E : 各検体添加時の生存細胞数

F : 検体無添加時の細胞数

【0097】これらのことから、本発明の抽出物は、優れたメラニン生成抑制機能を有する美白剤として公知のアルブチンやコウジ酸等に比べ皮膚への毒性が低いため、多量に皮膚へ塗布することが可能である。つまり、実際に皮膚へ使用した場合に与えることが可能な美白効果は非常に大きく、前述の通りアルブチンに比べても効果が大きいものとなる。また、これは、化粧料等へ比較的高濃度で配合することができるということでもあるので、本発明の抽出物を配合した化粧料等は皮膚に対する美白効果が高いものになる。アルブチンのメラニン生成抑制機能および皮膚への毒性を基準にして、実際に皮膚に塗布できる量とその美白効果の総量、つまり、実質的に皮膚に塗布し与えられる美白効果の指標としては、実質メラニン生成抑制機能指数が下記<式6>により求められる。この実質メラニン生成抑制機能指数で表わすと、本発明の抽出物の実質メラニン生成抑制機能指数は、アルブチンをポジティブコントロールとした場合、1~10程度であり、非常に高いことから、アルブチンに比べても実際に皮膚に与えることができる美白効果は高い。更に濃縮・精製を行えば、実質メラニン生成抑制機能指数も高いものとすることができる、例えば水への溶解性を利用して濃縮された抽出物は実質メラニン生成抑制機能指数が8~20程度まで向上している。

【0098】

【数6】 <式6> 実質メラニン生成抑制機能指数 = メラニン生成抑制機能指数 ÷ 皮膚への毒性指数

【0099】ここで、本発明の製造方法によると、メラニン生成抑制機能の強い抽出物を得ることができ、さらに、その単位原料あたりの収率も高い。この双方のことから、メラニン生成抑制機能の強さに、単位原料あたりの収率を乗じた、下記<式7>および<式8>によって求められるメラニン生成抑制機能収量指数および実質メラニン生成抑制機能収量指数について、他の天然原料を用いた場合に比べて、大幅に高い値が得られる。つまり、単位原料あたりに得られるメラニン生成抑制機能の総量が大きいということである。よって、本抽出物を生産し、使用することで、皮膚に対する美白効果が強い製品はもちろん、他の天然の美白剤等と置き換えた場合、単位原料から得られるメラニン生成抑制機能および実質メラニン生成抑制機能の総量が大きいため、より多くの

製品をつくることができる、ということであり、これは、コスト面からのメリットも期待できるということである。

【0100】

【数7】 <式7> メラニン生成抑制機能収量指数 = メラニン生成抑制機能の指數 × 単位原料あたりの収率 (%)

【0101】

【数8】 <式8> 実質メラニン生成抑制機能収量指数 = 実質メラニン生成抑制機能指數 × 単位原料あたりの収量 (%)

【0102】 本発明の抽出物と他の天然抽出物のそれぞれのメラニン生成抑制機能収量指数および実質メラニン生成抑制機能指數等を比較すると、本発明の抽出物は、例えば比較的皮膚に対する美白効果が強いゴマ粕由来の水溶性抽出物に対し、メラニン生成抑制機能指數は粗抽出物で2~15倍程度と高く、更に濃縮や分画・精製を行えば10~50倍程度と非常に高いものになる。また、実質メラニン生成抑制機能指數は2~15倍程度であり、収率は1~10倍程度であり、メラニン生成抑制機能収量指數は2~30倍程度、実質メラニン生成抑制機能収量指數は2~40倍程度になる。

【0103】 本発明の抽出物は、他の天然の美白成分と比較しても、メラニン生成抑制機能、収率等が上回り、メラニン生成抑制機能指數、実質メラニン生成抑制機能指數が大幅に上回ることから、単位原料あたりに得られるメラニン生成抑制機能の総量（メラニン生成抑制機能収量指數、実質メラニン生成抑制機能収量指數）が大きいということである。よって、本抽出物を生産し、使用することで、皮膚に対する美白効果が強い製品はもちろん、他の天然の美白剤等と置き換えた場合、単位原料から得られる美白効果の総量が大きいためより多くの製品をつくることができる、ということであり、これは、コスト面からのメリットも期待できるということである。また、このメラニン生成抑制機能収量指數、実質メラニン生成抑制機能収量指數を参考とすることで、好適な生産条件を決めることもできる。

【0104】 本発明の抽出物は腫瘍細胞増殖抑制・死滅機能を有する。腫瘍細胞増殖抑制・死滅機能とは、既に体内に発生してしまった腫瘍細胞、特に癌細胞が、それ以上増殖し生体に悪影響を及ぼすことが出来ないようになると、死滅されること、および細胞活動をしていくことが出来ないようになります。これは、臨床的には癌の進行を食い止めるために、さらには癌患者を正常な体に戻すことに大きく寄与するものであり、また日常的な摂取では予防的に、すなわち目に見えないレベルでの癌の進行を抑えること、あるいは目に見えないレベルで発生した癌細胞を死滅させることに大きく寄与することができる。

【0105】 腫瘍細胞増殖抑制・死滅機能については、以下に示すようなB-16メラノーマ細胞を用いた方法

で評価する。すなわち、6穴プレートにB-16メラノーマ細胞を所定量播種し、37°C、二酸化炭素濃度5%にて静置、培養したのに、翌日および培養5日目に検体（オリーブ各種抽出物）調製液を所定濃度になるように添加し、培養6日目に生存細胞数をカウントし、これから細胞増殖率を求め、腫瘍細胞増殖抑制・死滅機能を評価する。検体試料無添加での細胞増殖率（コントロール）と比較する。

【0106】本発明の抽出物では、非常に低濃度の添加でも、濃度依存的にB-16メラノーマ細胞の増殖を抑制、あるいはB-16メラノーマ細胞を死滅させる。すなわち、本発明の抽出物は、非常に強力な腫瘍細胞増殖抑制・死滅機能を有する。また、低濃度でも効果を発揮することから、期待する腫瘍細胞増殖抑制・死滅機能を発揮するための添加量が比較的少なくて済み、より副作用の無い範囲での効果が期待できる。また、濃度依存的に有効であるため、添加量の増減により、使用の目的や必要とする効果に応ずることができる。

【0107】本発明の抽出物は、常法にしたがって経口、非経口の製品に配合することができ、飲食物、皮膚外用剤、医薬品、医薬部外品、飼料、飼料、農業等の様々な分野で利用することができる。例えば、飲食料に配合した場合には、生体内抗酸化効果および酸化防止効果が好適な飲食物を提供することができる。この飲食料は例えば、風味劣化・変色抑制等の効果が期待でき、かつ、生活習慣病予防等の効果が期待できる。生活習慣病予防等の効果からは、健康食品、栄養食品等として用いられることも期待できる。さらには、抽出物の濃縮等の条件を調整することで、これを含有する飲食料を継続的に摂取することで抗腫瘍効果や皮膚の美白効果や皮膚への抗老化効果等の美肌効果を発揮する機能的な飲食物を提供することができる。また、本発明の抽出物を配合した皮膚外用剤は優れた美肌効果を有し、特に優れた美白効果と皮膚に対する抗老化効果を有する皮膚外用剤、特に化粧料を提供することができる。ここで、皮膚外用剤とは、皮膚に対して使用するものであり、医薬品、医薬部外品、化粧料を含むものであり、その形態としては特に限定されず、例えば、乳液、クリーム、化粧水、パック、洗浄料等のスキンケア化粧料、口紅、ファンデーション等のメーキャップ化粧料、頭皮用化粧料や、軟膏剤、分散液、クリーム剤、外用液剤などの医薬品等をいう。イメージが良いオリーブ由来であることは、使用者

に対して、精神的な爽快感、安心感を与えるため好ましいといえる。医薬品や医薬部外品としては、上記の他、特に腫瘍細胞増殖抑制・死滅機能を高めた抽出物を用いることによって抗腫瘍効果を有する医薬品等を提供することができる。また、活性酸素除去機能やメラニン生成抑制機能を高めた抽出物を用いることによって、各種疾患予防効果や抗老化効果等の生体内抗酸化効果や、皮膚抗老化効果や美白効果等の美肌効果を有する医薬品等を

提供することができる。その他、家畜、魚類の飼料、餌料に利用することができ、特に魚類の餌料は水分を必須とするものが多く放置すると酸化劣化し易いものがあり、また、水中投下するので水と接した時に易いが、これらを改善した餌料等を提供することができる。また、併せて、一部には飼育の困難な鑑賞用や養殖等の魚類も存在するが、本発明の抽出物を用いた餌料等は生体内抗酸化効果等の効果を有することから、これらの育成・生存率の向上に寄与する餌料等を提供することができる。

【0108】さらに、油分を含む実から抽出する場合、油分を含有する含油抽出物を得ることができ。油分を含んだ実から抽出される含油抽出物は、対象とする製品が油分を必要とするものである場合、好適に使用できる利点があり、また、この含油抽出物に乳化剤を添加することで、オリーブ100%の乳化組成物が得られ、該組成物も上記同様に広い用途に好適に使用できる。

【0109】各機能を効率的に得るために好ましくは濃縮、分画・精製した抽出物を有効成分とした各種の製剤を得ることができる。本発明は該抽出物を有効成分とする各種製剤に関するものであり、特に本発明の抽出物を有効成分とする活性酸素除去剤、メラニン生成抑制剤、腫瘍細胞増殖抑制・死滅剤に関する。

【0110】本発明の抽出物を有効成分とする活性酸素除去剤に関する。有効成分とは目的とする機能が発揮される程度に該抽出物を含むことを示す。その含量は、特に制限されないが、目的とする機能の度合い、使用態様、使用量、抽出物の濃縮や分画・精製度合い等により適宜調整することができ、例えば0.01~100質量%、好ましくは0.1~99.9質量%、更に好ましくは0.5~99.5質量%である。抽出物はオリーブ植物および/またはオリーブ油製造工程で得られる生成物を水および/または有機溶媒で抽出処理して得ることができ、更に抽出物を濃縮処理および/または分画・精製処理することで、効果が強化された活性酸素除去剤を得ることができる。該活性酸素除去剤は、人体やその他の飲食物、医薬品、肥料、飼料や皮膚外用剤に使用することができる。また、経口等により内服することも、皮膚等に塗布することもできる。

【0111】本発明の抽出物を有効成分とするメラニン生成抑制剤に関する。上記同様に有効成分とは目的とする機能が発揮される程度に該抽出物を含むことを示す。その含量は、特に制限されないが、目的とする機能の度合い、使用態様、使用量、抽出物の濃縮や分画・精製度合い等により適宜調整することができ、例えば0.001~100質量%、好ましくは0.01~99.9質量%、更に好ましくは0.05~99.5質量%である。抽出物はオリーブ植物および/またはオリーブ油製造工程で得られる生成物を水および/または有機溶媒で抽出処理して得ることができ、更に抽出物を濃縮処理および/または分画・精製処理することで、効果が強化さ

れたメラニン生成抑制剤を得ることができる。該メラニン生成抑制剤は、人体やその他飲食物、医薬品、肥料、飼料や皮膚外用剤に使用することができる。また、経口等により内服することも、皮膚等に塗布することもできる。

【0112】本発明の抽出物を有効成分とする腫瘍細胞増殖抑制・死滅剤に関する。上記同様に有効成分とは目的とする機能が発揮される程度に該抽出物を含むことを示す。その含量は、特に制限されないが、目的とする機能の度合い、使用態様、使用量、抽出物の濃縮や分画・精製度合い等により適宜調整することができ、例えば0.001～100質量%、好ましくは0.01～9.9質量%、更に好ましくは0.05～99.5質量%である。抽出物はオリーブ植物および／またはオリーブ油製造工程で得られる生成物を水および／または有機溶媒で抽出処理して得ることができ、更に抽出物を濃縮処理および／または分画・精製処理することで、効果が強化された腫瘍細胞増殖抑制・死滅剤を得ることができる。該腫瘍細胞増殖抑制・死滅剤は、人体やその他飲食物、医薬品、肥料、飼料や皮膚外用剤に使用することができる。また、経口により投与することも注射により投与することも、患部に塗布することもできる。

【0113】本発明の抽出物は上述の様な活性酸素除去機能、メラニン生成抑制機能、腫瘍細胞増殖抑制・死滅機能等の1次的な機能を有するが、これらの機能を有する抽出物を人体やその他飲食物、医薬品、肥料、飼料や皮膚外用剤に使用することで、様々な2次的な効果を得ることができる。今までにも述べているが、例えば、抗酸化効果、美肌効果、抗腫瘍効果等を得ることができる。

【0114】抗酸化効果とは、食品や生体内における脂質、蛋白質、炭水化物、核酸等の様々な成分が酸化され、本来の成分とは異なる成分に変換または分解されてしまうことを抑制あるいは防止する効果である。したがってこの効果は、生体内または食品や医薬品、農薬等に含まれる成分の酸化的劣化の防御の点で有用であり、食品産業、特に水産加工品、健康食品、栄養食品のほか、医薬品・農薬分野や化粧品分野において実利的な利用が期待されるものである。具体的には飲食物、医薬品、肥料、飼料や皮膚外用剤等の製品の保存性向上効果等の酸化防止効果、各種疾病防止効果や抗老化効果等の生体内抗酸化効果等を得ることができる。

【0-1-1-5】酸化防止効果とは、飲食料、皮膚外用剤、医薬品、飼料等に含有される酸化され易い成分、特に不飽和脂肪酸を含む脂質等の酸化劣化を防止する効果を示す。飲食料、皮膚外用剤、医薬品、飼料等に含有される成分の酸化劣化は、その品質劣化、栄養性・機能性低下等の保存安定性上の問題の大きな原因となる。したがって、各種成分の酸化を抑えることができれば、飲食料、皮膚外用剤、医薬品、飼料等の品質を安定化および保持

することができる。この点において、本発明の抽出物は、活性酸素除去機能を有するため、各種成分の酸化を最小限に抑えることが期待でき、非常に好ましい。すなわち、本発明の抽出物は、飲食料、皮膚外用剤、医薬品、飼料等に含有される成分の酸化を防止することで、その保存安定性向上、品質向上、栄養性・機能性保持等に大きく寄与するものである。

【0116】本発明の抽出物は、実際に該抽出物を含有する飲食物や化粧品を作成した場合、該抽出物を含有していない同等品と比べて、明らかな酸化防止効果を有している。すなわち、例えば、クッキーを作製し、60℃、暗所で18日間保存した後、常法に則って保存後のクッキーから油分を抽出し、そのPOVを測定比較すると、本発明の抽出物は、明らかにクッキーの主に油脂の酸化を防止しており、高い酸化防止効果を有することが分かる。また同時に、本発明の抽出物の酸化防止効果は、実際に該抽出物を含有する飲食物や化粧品を作成した場合、該抽出物を含有していない同等品と比べて、明らかに保存安定性が向上していることからも明らかである。すなわち、例えば、クッキーを作製し、60℃、暗所で18日間保存した後に試食した結果では、該抽出物を含有していないクッキーはかなりの酸化劣化臭を有していたのにに対し、本発明の抽出物を配合したクッキーは明らかに良好な風味を保持することから、抽出物の酸化防止効果により保存安定性が向上していることが分かる。

【0117】また、生体内抗酸化効果とは、生体内においてその生成を免れることができない活性酸素種を除去することで、生命活動において重要な生体成分を保護する効果を示す。一般に、生体内で発生した活性酸素種は、脂質、蛋白質、糖質、核酸等の生命活動において重要な生体成分、特には不飽和脂肪酸を含有する脂質類を強力に酸化し、本来の成分とは異なる成分に変換または分解してしまう。さらに、この様な現象が体内に蓄積することが様々な疾病や老化現象の原因となることが知られているが、これに対して生体内抗酸化効果を有するものの適用が、これら疾病や老化の予防や改善につながることも明らかになってきている。したがって、本発明の抽出物は、その活性酸素除去機能により得られる生体内抗酸化効果により、生体成分を保護するものであり、ひいては、活性酸素種等が引き起こす様々な疾病や老化現象を予防および改善するものである。

【0-1-1-8】本発明の抽出物の生体内抗酸化効果は、例えば、動物試験によって検討することができる。その試験とはすなわち、ラットを用いて、該抽出物を含有する飼料を与えた場合と、通常の餌組成である飼料を与えた場合とで、生体内抗酸化力に如何なる差が生じるかを検討するものである。この結果は人間に對しても同様の傾向を示す。生体内抗酸化力とは、具体的には例えば、ラットの肝臓そのものの抗酸化力を測定すればよい。この

31

試験において、該抽出物を含有する飼料を与えた場合は、通常の餌組成である飼料を与えた場合に比べて、有意に生体内抗酸化力が向上している。すなわち、本発明の抽出物は、明らかに生体内抗酸化効果を有することが分かる。また同様にして、該抽出物の投与量を増減した場合には、投与量依存的に生体内抗酸化力が変動する。すなわちこれは、該抽出物の投与量と生体内抗酸化効果がほぼ比例関係にあることを示しており、該抽出物の生体内抗酸化効果はその投与量に依存的であるといえる。このことは、本発明の抽出物を各種用途に展開した場合に、その使用量に応じた生体内抗酸化効果を得られるとということなので、その使用の目的、手段等に応じて適宜使用量を決められるというメリットがあり、大変好ましい。

【0119】美肌効果とは、紫外線暴露、ホルモンバランスの変化、遺伝的プログラム等の様々な要因により発生する皮膚の色黒やシミ、ソバカスを改善あるいは防止する効果、肌のくすみを軽減する効果、肌を透明感のある美しいものにする、あるいは透明感のある美しい肌を保つ効果、肌のツヤ・張りを増す効果、肌をみずみずしいものにする、あるいはみずみずしい肌を保つ効果、肌の老化現象進行を抑制・防止する効果等を示す。また、直接見た目の効果ではないが、皮脂成分の酸化劣化等による体臭等の匂いの発生を抑制する効果も得ることができ、これも広い意味での美肌効果といえる。本発明の抽出物を配合した皮膚外用剤等では、本抽出物が有する活性酸素除去機能およびメラニン生成抑制機能により、上記いずれの美肌効果をも有するが、特に皮膚の色黒やシミ、ソバカス、くすみを改善あるいは防止する美白効果および、肌の老化現象進行を抑制・防止する皮膚の抗老化効果の点において優れている。

【0120】美白効果とは、紫外線暴露、ホルモンバランスの変化、遺伝的プログラム等の様々な要因により発生する皮膚の色黒やシミ、ソバカス、くすみを改善あるいは防止する効果を示す。一般に、皮膚の色黒やシミ、ソバカス、くすみは、紫外線による刺激やホルモンバランスの変化等によってメラノサイトが刺激され、そこで生成されたメラニン色素が皮膚に沈着して発生することが知られている。したがって、メラニンの生成を抑えることができれば、皮膚の色黒やシミ、ソバカス、くすみを予防・改善することが可能である。この点において、本発明の抽出物を配合した皮膚外用剤等では、本抽

出物がメラニン生成抑制機能を有するため、メラニン色素の生成を最小限に抑えることができることから、該皮膚外用剤等は、皮膚の色黒やシミ、ソバカス、くすみを改善あるいは防止することができ、優れた美白効果を有する。

【0121】美白効果については、実際に本発明の抽出物を配合したクリーム、化粧水、乳液等の様々な皮膚外用剤等を処方し、該皮膚外用剤等を用いて女性パネルに

10

10 よる官能評価試験を行うことによって評価できる。すな

わち、処方した被験皮膚外用剤等に対して、20代～50代の女性15名をパネルとし、毎日朝と夜の2回、複数週間にわたって皮膚に塗布する。塗布による美白効果は、肌のシミ、ソバカス、くすみを目立たなくする効果について有効、やや有効、無効の3段階の官能試験結果を得ることで評価できる。この評価においては、本発明の抽出物を配合した皮膚外用剤等は、比較品としてアルブチン等を配合した場合に比べても同等以上の美白効果を有する。すなわち、該皮膚外用剤は、優れた美白効果を有する。

【0122】皮膚の抗老化効果とは、紫外線暴露等により発生する皮膚の光老化や、ホルモンバランスの変化、活性酸素傷害等の加齢に伴う皮膚の老化を予防・改善する効果を示す。一般に、シワやたるみを引き起す要因として、紫外線暴露や生命活動に伴って生じる活性酸素種が、皮膚の構成成分である脂質、糖質、蛋白質等に障害を起こすことが知られている。したがって、これら活性酸素種を消去することができれば、これらのシワやたるみ、すなわち、皮膚の老化を予防・改善することができる。この点において、本発明の抽出物を配合した皮膚外用剤等では、本抽出物がスーパーオキシド消去活性およびヒドロキシラジカル消去活性等の活性酸素除去機能を有するため、活性酸素種の影響を最小限に抑えることができることから、該皮膚外用剤は、皮膚のシワやたるみ等の皮膚の老化を改善あるいは防止することができ、優れた皮膚の抗老化効果を有する。

【0123】皮膚の抗老化効果についても、美白効果の評価の場合と同様に、実際に本発明の抽出物を配合した

30 クリーム、化粧水、乳液等の様々な皮膚外用剤等を処方し、該皮膚外用剤等を用いて女性パネルによる官能評価試験を行うことによって評価できる。すなわち、処方した被験皮膚外用剤等に対して、20代～50代の女性15名をパネルとし、毎日朝と夜の2回、複数週間にわたって皮膚に塗布する。塗布による皮膚抗老化効果は、肌のはり、つやが付与され、また、シワ、たるみが改善される効果について有効、やや有効、無効の3段階の官能試験結果を得ることで評価できる。この評価においては、本発明の抽出物を配合した皮膚外用剤等は、比較品としてゴマ脱脂粕抽出物を配合した場合に比べても同等以上の皮膚の抗老化効果を有する。すなわち、該皮膚外用剤は、優れた皮膚の抗老化効果を有する。

【0-1-2-4】-本発明の抽出物は、その腫瘍細胞増殖抑制・死滅機能により得られる抗腫瘍効果を有するが、特に腫瘍増殖・転移抑制効果に優れている。

【0125】腫瘍増殖・転移抑制効果とは、既に体内に発生してしまった腫瘍、特には癌が、それ以上増殖し生体に悪影響を及ぼすことが出来ないようにすること、および他部位に転移し増殖する過程において、血流等に乗っている間にこれを死滅させたり、他部位に辿り着いて

すぐに増殖することを抑制する効果を示す。これは、臨床的には癌の進行を食い止めること、あるいは癌が体中に蔓延しないようにすることに大きく寄与するものであり、また日常的な摂取では予防的に、すなわち目に見えないレベルでの癌の進行を抑えること、あるいは目に見えないレベルでの転移を防止することに大きく寄与することができる。特に腫瘍増殖・転移抑制効果等を得ることができる。

【0126】腫瘍増殖・転移抑制効果の評価は悪性黒色腫増殖・転移抑制試験等により行うことができる。すなわち、ラットに、あらかじめ調製したB16メラノーマ細胞の懸濁液を静脈注射し、注射後2日目から1日おきに、所定濃度の検体を溶解させた綿実油を、注射により腹室内投与あるいはゾンデを用いて経口投与する。なお、コントロール群には綿実油のみを投与する。B16メラノーマ細胞注射後15日目に肺に転移した癌病巣を摘出し、その総体積から増殖抑制率を、肺に転移した癌病巣数から転移抑制率をそれぞれ算出する。この増殖抑制率、転移抑制率から腫瘍増殖・転移抑制効果の評価を行う。この結果は人間に対しても同様の傾向を示す。この評価においては、発癌プロモーター阻害剤として公知であるオレアノール酸の投与では、コントロール（無投与）群との有意差が無く、腫瘍増殖・転移抑制効果が見られないが、本発明の抽出物の投与では、コントロール（無投与）群に対して有意に差があり、明らかに悪性黒色腫の増殖・転移を抑制する。すなわち、本発明の抽出物は、非常に強力な腫瘍増殖・転移抑制効果を有する。比較的少ない投与量でも効果を発揮することから、期待する腫瘍増殖・転移抑制効果を発揮するための添加量が少なくて済み、より副作用の無い範囲での効果が期待できる。また、濃度依存的に有効であるため、添加量の増減により、使用の目的や必要とする効果に応ずることができる。

【0127】本発明の抽出物の原料であるオリーブは、安定に入手することができる植物原料である。天然由来であり、食品・食用として広く用いられているオリーブを原料として得られる抽出物であることから、人体にとって安全性の高い抽出物であるといえる。本発明によれば、様々な機能を有するオリーブ抽出物を得ることができ、特に活性酸素除去機能、メラニン生成抑制機能、腫瘍細胞増殖抑制・死滅機能を有する抽出物を得ることができる。さらに、該抽出物を濃縮・分画・精製処理する

ことで各機能向上させることや、各機能の強さ等を調整し機能全体の組合せを設計することができるため、濃縮条件等を調整することにより、求める機能を有するオリーブ抽出物を得ることができる。また、本発明の抽出物は、飲食料、皮膚外用剤等の様々な用途に利用することができます。また、得られる2次的な効果として、抗酸化効果、美肌効果、抗腫瘍効果等が挙げられ、さらに、オリーブ植物から容易に得ることができ、また、オリーブ

油の製造工程中に発生する通常は廃棄されている生成物からも好適に得ることができることから、コスト面、安定的な供給という面、資源の有効活用という面からみても好ましい。

【0128】

【実施例】次に、実施例を挙げ、本発明をさらに説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0129】実施例1～20、比較例1において各種抽出物を製造した。また、収率については下記の<式9>で求めた。

【0130】

【数9】<式9> 抽出物の収率=本発明の抽出物の質量(注1)÷抽出前の原料の質量
(注2)

注1：凍結乾燥により乾燥させた後、質量(g)を測定

注2：本発明の抽出物を、溶剤等で抽出する直前の果実、粕、種子の質量(g)を測定

【0131】実施例1

20 国産のオリーブ(Olea europaea L.)の乾燥果実(種子を含む)1kgを破碎し、3Lのヘキサンを加え3時間抽出した。これを4度繰り返した脱脂果実について、種子を除去した後、粉碎し、再度5倍量のヘキサンで3時間抽出することで、完全に油分を除去した脱脂粕229gを得た。この脱脂粕に10倍量のエタノール含量が60質量%の含水エタノール水溶液を加え、室温で激しく攪拌しながら3時間抽出した。全量をろ過後、ろ液を濃縮乾固して抽出物112.7gを得た。得られた抽出物に關し、スーパーオキシド消去活性

30 やおよびヒドロキシラジカル消去活性の評価を行った。その結果を表1および表2に示す。また、得られた抽出物のメラニン生成抑制機能の評価結果(細胞白色化度と細胞生存率)を表4に、収率、メラニン生成抑制機能指数、実質メラニン生成抑制機能指数、メラニン生成抑制機能収量指数、実質メラニン生成抑制機能収量指数を表5に示す。

【0132】実施例2

実施例1と同様の方法により得た脱脂粕に、10倍量のエタノール含量が80質量%の含水エタノール水溶液を加え、同様に室温で激しく攪拌しながら3時間抽出した。全量をろ過後、ろ液を濃縮乾固して抽出物79.7gを得た。得られた抽出物に關し、スーパーオキシド消

40 去活性の評価を行った結果を表1に示す。また、得られた抽出物のメラニン生成抑制機能の評価結果(細胞白色化度と細胞生存率)を表4に、収率、メラニン生成抑制機能指数、実質メラニン生成抑制機能指数、メラニン生成抑制機能収量指数、実質メラニン生成抑制機能収量指数を表5に示す。

【0133】実施例3

50 実施例1と同様の方法により得た脱脂粕に、10倍量の

エタノール含量が70質量%の含水エタノール水溶液を加え、同様に室温で激しく攪拌しながら3時間抽出した。全量をろ過後、ろ液を濃縮乾固して抽出物97.8gを得た。得られた抽出物に関し、スーパーオキシド消去活性の評価を行った結果を表1に示す。また、得られた抽出物のメラニン生成抑制機能の評価結果（細胞白色化度と細胞生存率）を表4に、収率、メラニン生成抑制機能指数、実質メラニン生成抑制機能指数、メラニン生成抑制機能収量指数、実質メラニン生成抑制機能収量指數を表5に示す。

【0134】実施例4

実施例1と同様の方法により得た脱脂粕に、10倍量のエタノール含量が50質量%の含水エタノール水溶液を加え、同様に室温で激しく攪拌しながら3時間抽出した。全量をろ過後、ろ液を濃縮乾固して抽出物111.1gを得た。得られた抽出物に関し、スーパーオキシド消去活性の評価を行った結果を表1に示す。また、得られた抽出物のメラニン生成抑制機能の評価結果（細胞白色化度と細胞生存率）を表4に、収率、メラニン生成抑制機能指数、実質メラニン生成抑制機能指数、メラニン生成抑制機能収量指数、実質メラニン生成抑制機能収量指數を表5に示す。

【0135】実施例5

実施例1と同様の方法により得た脱脂粕に、10倍量のエタノール含量が40質量%の含水エタノール水溶液を加え、同様に室温で激しく攪拌しながら3時間抽出した。全量をろ過後、ろ液を濃縮乾固して抽出物112.9gを得た。得られた抽出物に関し、スーパーオキシド消去活性の評価を行った結果を表1に示す。また、得られた抽出物のメラニン生成抑制機能の評価結果（細胞白色化度と細胞生存率）を表4に、収率、メラニン生成抑制機能指数、実質メラニン生成抑制機能指数、メラニン生成抑制機能収量指数、実質メラニン生成抑制機能収量指數を表5に示す。

【0136】実施例6

実施例1と同様の方法により得た脱脂粕に、10倍量のエタノール含量が20質量%の含水エタノール水溶液を加え、同様に室温で激しく攪拌しながら3時間抽出した。全量をろ過後、ろ液を濃縮乾固して抽出物110.6gを得た。得られた抽出物に関し、スーパーオキシド消去活性の評価を行った結果を表1に示す。また、得られた抽出物のメラニン生成抑制機能の評価結果（細胞白色化度と細胞生存率）を表4に、収率、メラニン生成抑制機能指数、実質メラニン生成抑制機能指数、メラニン生成抑制機能収量指数、実質メラニン生成抑制機能収量指數を表5に示す。

【0137】実施例7

実施例1と同様の方法により得た脱脂粕に、10倍量の無水エタノールを加え、同様に室温で激しく攪拌しながら3時間抽出した。全量をろ過後、ろ液を濃縮乾固して

抽出物13.5gを得た。得られた抽出物に関し、スーパーオキシド消去活性の評価を行った結果を表1に示す。また、得られた抽出物のメラニン生成抑制機能の評価結果（細胞白色化度と細胞生存率）を表4に、収率、メラニン生成抑制機能指数、実質メラニン生成抑制機能指数、メラニン生成抑制機能収量指数、実質メラニン生成抑制機能収量指數を表5に示す。

【0138】実施例8

実施例1と同様の方法により得た脱脂粕に、10倍量の水を加え、同様に室温で激しく攪拌しながら3時間抽出した。全量をろ過後、ろ液を濃縮乾固して抽出物118.2gを得た。得られた抽出物に関し、スーパーオキシド消去活性の評価を行った結果を表1に示す。

【0139】実施例9

実施例1と同様の方法により得た脱脂粕に、10倍量のアセトン含量が60質量%の含水アセトンを加え、同様に室温で激しく攪拌しながら3時間抽出した。全量をろ過後、ろ液を濃縮乾固して抽出物51.5gを得た。得られた抽出物に関し、スーパーオキシド消去活性の評価を行った結果を表1に示す。

【0140】実施例10

実施例1と同様の方法により得た脱脂粕に、10倍量のTHF含量が60質量%の含水THFを加え、同様に室温で激しく攪拌しながら3時間抽出した。全量をろ過後、ろ液を濃縮乾固して抽出物54.3gを得た。得られた抽出物に関し、スーパーオキシド消去活性の評価を行った結果を表1に示す。

【0141】実施例11

実施例1と同様の方法により得た脱脂粕に、10倍量のAN含量が60質量%の含水ANを加え、同様に室温で激しく攪拌しながら3時間抽出した。全量をろ過後、ろ液を濃縮乾固して抽出物49.6gを得た。得られた抽出物に関し、スーパーオキシド消去活性の評価を行った結果を表1に示す。

【0142】実施例12

種子を除去したオリーブの乾燥果実1kgを破碎し、その破碎した果実に、20倍量のエタノール含量が60質量%の含水エタノール水溶液を加え、同様に室温で激しく攪拌しながら3時間抽出した。全量をろ過後、ろ液を濃縮乾固して抽出物238.5g抽出物にヘキサン1.5L、水1.5Lを加えてよく攪拌した後、分液された水相を濃縮乾固して、分配抽出物126.4gを得た。

得られた抽出物に関し、スーパーオキシド消去活性の評価を行った結果を表1に示す。また、得られた抽出物のメラニン生成抑制機能の評価結果（細胞白色化度と細胞生存率）を表4に、収率、メラニン生成抑制機能指数、実質メラニン生成抑制機能指数、メラニン生成抑制機能収量指数、実質メラニン生成抑制機能収量指數を表5に示す。

【0143】実施例13

37

オリーブの種子500gを破碎し、その破碎した種子に10倍量のエタノール含量が60質量%の含水エタノール水溶液を加え、同様に室温で激しく攪拌しながら3時間抽出した。全量をろ過後、ろ液を濃縮乾固して抽出物42.0gを得た。得られた抽出物に関し、スーパーオキシド消去活性の評価を行った結果を表1に示す。また、得られた抽出物のメラニン生成抑制機能の評価結果(細胞白色化度と細胞生存率)を表4に、収率、メラニン生成抑制機能指数、実質メラニン生成抑制機能指数、メラニン生成抑制機能収量指数、実質メラニン生成抑制機能収量指数を表5に示す。

【0144】実施例14

イタリア産のオリーブ(Olea europaea L.)を搾油し、得られた圧搾残渣1kgに、3Lのヘキサンを加え3時間抽出した。これを4度繰り返した脱脂残渣(884g)について、種子および夾雑物をフライで適当に除去して、脱脂粕196gを得た。この脱脂粕に10倍量のエタノール含量が60質量%の含水エタノール水溶液を加え、室温で激しく攪拌しながら3時間抽出した。全量をろ過後、ろ液を濃縮乾固して抽出物19.2gを得た。得られた抽出物に関し、スーパーオキシド消去活性の評価を行った結果を表1に示す。また、得られた抽出物のメラニン生成抑制機能の評価結果(細胞白色化度と細胞生存率)を表4に、収率、メラニン生成抑制機能指数、実質メラニン生成抑制機能指数、メラニン生成抑制機能収量指数、実質メラニン生成抑制機能収量指数を表5に示す。

【0145】実施例15

実施例14と同様の方法により得た脱脂粕に、10倍量のエタノール含量が70質量%の含水エタノール水溶液を加え、室温で激しく攪拌しながら3時間抽出した。全量をろ過後、ろ液を濃縮乾固して抽出物17.4gを得た。得られた抽出物に関し、スーパーオキシド消去活性の評価を行った結果を表1に示す。また、得られた抽出物のメラニン生成抑制機能の評価結果(細胞白色化度と細胞生存率)を表4に、収率、メラニン生成抑制機能指数、実質メラニン生成抑制機能指数、メラニン生成抑制機能収量指数、実質メラニン生成抑制機能収量指数を表5に示す。

【0146】実施例16

イタリア産のオリーブ(Olea europaea L.)を搾油し、得られた圧搾残渣1kgに、3Lのヘキサンを加え3時間抽出した。これを4度繰り返した脱脂残渣884gについて、種子等を除去すること無く、これを粉碎し、粉碎脱脂残渣873gを得た。この粉碎脱脂残渣に10倍量のエタノール含量が60質量%の含水エタノール水溶液を加え、室温で激しく攪拌しながら3時間抽出した。全量をろ過後、ろ液を濃縮乾固して抽出物39.5gを得た。得られた抽出物に関し、スーパーオキシド消去活性の評価を行った結果を表1に示す。

38

また、得られた抽出物のメラニン生成抑制機能の評価結果(細胞白色化度と細胞生存率)を表4に、収率、メラニン生成抑制機能指数、実質メラニン生成抑制機能指数、メラニン生成抑制機能収量指数、実質メラニン生成抑制機能収量指数を表5に示す。

【0148】実施例17

実施例16と同様にして得た粉碎脱脂残渣に、10倍量のエタノール含量が60質量%の含水エタノール水溶液を加え、室温で激しく攪拌しながら3時間抽出した。全量をろ過後、得られたろ液を完全に脱エタノールして得られた抽出物の水層部分に、水不溶分回収の効率を上げることを目的として、総量が830gになるように水を加え、室温で1時間、激しく攪拌した。全量を遠心分離で処理して沈殿分を除去した後、デカンテーションにより回収した上澄みを乾燥して濃縮物22.9gを得た。濃縮して得られた抽出物に関し、スーパーオキシド消去活性の評価を行った結果を表1に示す。

【0149】実施例18

実施例1で得られた抽出物100gに、水2Lを加え、室温で1時間、激しく攪拌した。全量を遠心分離で処理した後、上澄みはデカンテーションにより除去し、残った沈殿を乾燥して抽出濃縮物10.0gを得た。濃縮して得られた抽出物に関し、メラニン生成抑制機能の評価結果(細胞白色化度と細胞生存率)を表4に、収率、メラニン生成抑制機能指数、実質メラニン生成抑制機能指数、メラニン生成抑制機能収量指数、実質メラニン生成抑制機能収量指数を表5に示す。

【0150】実施例19

実施例14で得られた抽出物100gに、水2Lを加え、室温で1時間、激しく攪拌した。全量を遠心分離で処理した後、上澄みはデカンテーションにより除去し、残った沈殿を乾燥して抽出濃縮物42.0gを得た。濃縮して得られた抽出物に関し、メラニン生成抑制機能の評価結果(細胞白色化度と細胞生存率)を表4に、収率、メラニン生成抑制機能指数、実質メラニン生成抑制機能指数、メラニン生成抑制機能収量指数、実質メラニン生成抑制機能収量指数を表5に示す。

【0151】実施例20

オリーブ油製造工程で得られるイタリア産の抽出残渣1kgに、10倍量の、エタノール含量が65質量%である含水エタノールを加え、激しく攪拌しながら3時間抽出した。全量をろ過後、得られたろ液を完全に脱エタノ

ールして得られた抽出物の水層部分に、水不溶分回収の効率を上げることを目的として、総量が820gになるように水を加え、室温で1時間、激しく攪拌した。全量を遠心分離で処理した後、上澄みはデカンテーションにより除去し、残った沈殿を乾燥して濃縮物21.9gを得た。次にこの濃縮物を、約40倍量(880g)のシリカゲルを充填したカラムを用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供した。まず、充填したシリカゲル

の約5倍量(4.4L)のヘキサン：酢酸エチル=3:1の溶離液で、画分1を溶出させ、さらに、充填したシリカゲルの5倍量(4.4L)のヘキサン：酢酸エチル=3:1の溶離液で、画分2を溶出させた。続けて、充填したシリカゲルの2.5倍量(2.2L)のヘキサン：酢酸エチル=1:1の溶離液で、画分3を溶出させ、さらに、充填したシリカゲルの10倍量(8.8L)のヘキサン：酢酸エチル=1:1の溶離液で、目的とする画分4を溶出させた。各画分の中で、特に画分4において腫瘍細胞増殖抑制・死滅機能が確認されたことから、画分4についてヘキサンおよび酢酸エチルを除去後、真空乾燥して、目的とする分画精製物5..8gを得た。この分画精製物に関して、分画精製物の濃度が表7の記載の各濃度になるように調整し、細胞増殖率を算出して、腫瘍細胞増殖抑制・死滅機能を評価した。結果を表7に示す。

【0152】比較例1

乾燥ゴマ種子1kgを破碎し、3Lのヘキサンを加え3時間抽出した。これを4度繰り返したゴマ脱脂粕52.4gを得た。このゴマ脱脂粕に10倍量のエタノール含量が60質量%の含水エタノール水溶液を加え、室温で激しく攪拌しながら3時間抽出した。全量をろ過後、ろ液を濃縮乾固して抽出物58.2gを得た。このゴマ種子から得られた抽出物に銛し、スーパーオキシド消去活性およびヒドロキシラジカル消去活性の評価を行った。その結果を表1および表2に示す。また、得られた抽出物のメラニン生成抑制機能の評価結果(細胞白色化度と細胞生存率)を表4に、収率、メラニン生成抑制機能指数、実質メラニン生成抑制機能指数、メラニン生成抑制機能収量指数、実質メラニン生成抑制機能収量指数を表5に示す。

【0153】比較例2として、合成のスーパーオキシド消去活性を有する合成の抗酸化剤であるBHAに関し、スーパーオキシド消去活性の評価を行った。結果を表1に示す。

【0154】比較例3としてビタミンCリン酸マグネシウム、比較例4としてコウジ酸に関しメラニン生成抑制機能の評価を行い、その結果(細胞白色化度と細胞生存率)を表4に、メラニン生成抑制機能指数、実質メラニン生成抑制機能指数を表5に示す。

【0155】以下に、活性酸素除去機能、メラニン生成抑制機能、腫瘍細胞増殖抑制・死滅機能について、その

評価方法および評価結果を示す。活性酸素除去機能に関しては、スーパーオキシド消去活性、ヒドロキシラジカル消去活性についての評価方法および評価結果を示す。

【0156】<スーパーオキシド消去活性の評価方法>
スーパーオキシド消去活性の評価は、金田尚志、上田伸

夫編集、「過酸化脂質実験法」、第136-154頁、医歯薬出版(株)1993年発刊に記載されている方法に従い、以下のように測定した。炭酸水素ナトリウム緩衝液(pH10.2)1.2mLに1mg/mLのEDTA溶液50μL、1.5mg/mLウシ血清アルブミン(BSA)溶液50μL、0.6mg/mLニトロブルーテトラゾリウム(NBT)溶液50μL、0.5mg/mLキサンチン溶液50μLし、および、オリーブ抽出物を所定の濃度で溶解させた「試料溶液」0.1mLを加え混和した後、25°Cにて10分放置する。これに0.1unit/mLキサンチンオキシダーゼ(XOD)溶液50μLを加え攪拌し、25°Cにて20分間放置した。1mg/mL塩化銅溶液50μLを加え酵素反応を停止させた後、560nmの吸光度値(G)を測定し、「試料溶液」の代わりに同量の「緩衝液」を加えた物を対照溶液として同様に吸光度値(H)を測定した。また、塩化銅溶液と、「試料溶液」または「緩衝液」の添加順を逆にしたものと、それぞれ試薬ブランクとして同様に吸光度を測定し、それぞれの値をg、hとした。

一方、比較用の抗酸化剤としては、市販の抗酸化剤であるブチルヒドロキシアニソール(BHA)を用いた。BHAについては上記の測定方法を、以下の点を変更して吸光度値(G)測定した。すなわち、炭酸ナトリウム緩衝液(pH10.2)は1.25mLの添加量、メタノールを用いて所定の濃度で溶解した「BHA溶液」は50μLの添加量とし、また、XOD溶液は0.2unit/mLの濃度で調製したものを用いた。「BHA溶液」の代わりに同量の「メタノール」を添加したものを対照溶液として、吸光度値(H)を測定した。また、塩化銅溶液と「BHA溶液」または「メタノール」の添加順を逆にしたものと、それぞれ試薬ブランクとして同様に吸光度値を測定し、それぞれの値をg、hとした。そして、以下の式①からスーパーオキシドの消去活性を算出した。ここで、式中の(I)は測定溶液系中の試料濃度を示しており、スーパーオキシドが消去されることにより吸光度値が0.1減少する活性を1単位(1unit)と定義した。この活性値が高いほどスーパーオキシド消去作用が強いことを示している。

【0157】

$$40 \quad [\text{数}10] <\text{式}10> \text{スーパーオキシド消去活性} (\text{unit}/(\text{mg/mL})) = ((\text{H}-\text{h}) - (\text{G}-\text{g})) / (1 \times 0.1)$$

-[0-1-5-8]-また、スーパーオキシド消去活性収量指数を前記の<式2>により算出した。

【0159】

【表1】

	原料	抽出液	収率(%)	スーパーオキシド消去活性[unit/(mg/mL)]	スーパーオキシド消去活性収量指數
実施例1	脱脂粕①	60%:含水エタノール	49.2	60	2952
実施例2	脱脂粕①	80%:含水エタノール	34.8	31.2	1087
実施例3	脱脂粕①	70%:含水エタノール	42.7	68	2804
実施例4	脱脂粕①	50%:含水エタノール	48.5	58	2813
実施例5	脱脂粕①	40%:含水エタノール	49.3	56.3	2775
実施例6	脱脂粕①	20%:含水エタノール	48.3	33.6	1623
実施例7	脱脂粕①	100%:純水エタノール	5.9	25.9	153
実施例8	脱脂粕①	水	51.8	24.8	1281
実施例9	脱脂粕①	80%:含水アセトン	22.5	17.1	385
実施例10	脱脂粕①	60%:含水THF	23.7	16.9	448
実施例11	脱脂粕①	60%:含水AN	21.7	14.1	306
実施例12	脱脂果実不処理	60%:含水エタノール	12.8	42.4	534
実施例13	脱脂種子粉砕物	60%:含水エタノール	8.4	26.4	213
実施例14	脱脂粕②	60%:含水エタノール	9.8	23.4	229
実施例15	脱脂粕②	70%:含水エタノール	8.9	29.3	283
実施例16	脱脂粕③	60%:含水エタノール	4.6	22.8	103
実施例17	実施例16の濃縮物	水可溶分回収	2.6	39.5	103
比較例1	コマ脱脂粕	60%:含水エタノール	11.1	7	77
比較例2	BHA			26	-

抽出液の%は溶剤の含量を示し、質量%を意味する。

脱脂粕①: 国内産のオリーブの乾燥果実から種子を除き、脱脂したもの

脱脂粕②: イタリア産のオリーブの圧搾残渣から種子を除き、脱脂したもの

脱脂粕③: イタリア産のオリーブの圧搾残渣を脱脂したもの(種子含む)

【0160】表1から、本発明の抽出物は、非常に強いスーパーオキシド消去活性を有することがわかる。特に、水、無水アルコール、含水アルコールを用いて抽出した場合、本発明の抽出物は天然の抽出物であるにもかかわらず、代表的な合成抗酸化物質であるBHAと比較しても、同等～2倍程度の消去活性を示している。单なる抽出物の段階でも、非常に強いスーパーオキシド消去活性を有することがわかる。さらに、本発明の抽出物は収率が高いことから、スーパーオキシド消去活性収量指數は更に高いものとなっている。この指數から見ても分かる通り、同じ条件の天然原料から、より多くの、強い活性酸素除去機能を有する抽出物を得ることができることがわかる。

【0161】<ヒドロキシラジカル消去活性の評価方法>ヒドロキシラジカル消去活性は以下のように測定した。本実施例で用いた反応系はフェントン反応にてヒドロキシラジカルを発生させ、そのヒドロキシラジカルと脂肪酸との反応により生じるマロンジアルデヒド(MDA)をチオバルビツール酸と反応させたときに生成するチオバルビツール酸-MDAアダクトを測定する方法に基づいている。すなわち所定の濃度で溶解させた測定対象物を、リノール酸溶液(2mg/mL)およびドデシル硫酸ナトリウム(SDS, 2mg/mL)を含む30mMのTris塩酸緩衝液(pH7.4)0.46mL*40

*で溶解し、2.5mM過酸化水素溶液0.02mLおよび2.5mM塩化鉄(II)溶液0.02mLを加え、5h、37°Cで加温した。本発明の抽出物、濃縮物および精製物を含まず同様に反応したものを対照とした。加温後、10mg/mLブチルヒドロキシルトルエン(BHT)エタノール溶液0.01mLを加えた。TBA 12mgおよびSDS 16.2mgを蒸留水2.3mLに溶解し、これに20%(v/v)酢酸緩衝液(pH4.0)1.5mLおよび前記反応液0.2mLを加え、95°Cで1時間加温した。放冷後、(532nm)における吸光度を測定した。各試料を含む反応液の吸光度をJ、対照の吸光度をKとし、そのヒドロキシラジカル消去率を以下の<式11>から算出した。ヒドロキシラジカル消去率が高い方がヒドロキシラジカル消去作用が強いことを示している。

【0162】

$$[\text{数11}] <\text{式11}> \text{ヒドロキシラジカル消去率} (\%) = \{1 - (K - J)/K\} \times 100$$

【0162】上記ヒドロキシラジカル消去率(%)が50%となる測定対象物の濃度を比較し、ヒドロキシラジカル消去活性の強さを比較する。

【0163】

【表2】

	原料	抽出液	収率(%)	ヒドロキシラジカル消去率が50%になる液体濃度(mg/mL)
実施例1	脱脂粕①	60%:含水エタノール	49.2	0.69
比較例1	胡麻脱脂粕	60%:含水エタノール	11.1	0.65

抽出液の%は溶剤の含量を示し、質量%を意味する。

脱脂粕①: 国内産のオリーブの乾燥果実から種子を除き、脱脂したもの

【0163】表2から、本発明の抽出物はヒドロキシラジカル消去活性に関してても、ヒドロキシラジカル消去活性が強いとされているゴマ種子からの抽出物と比較して、同程度の消去活性を示している。また、このゴマ種子からの抽出物のスーパーオキシド消去活性と本発明の抽出物のスーパーオキシド消去活性を比較すると、約8倍～9倍である。このように本発明の抽出物は、強いスーパーオキシド消去活性とヒドロキシラジカル消去活性

から得られる抽出物のスーパーオキシド消去活性と本発明の抽出物のスーパーオキシド消去活性を比較すると、約8倍～9倍である。このように本発明の抽出物は、強いスーパーオキシド消去活性とヒドロキシラジカル消去活性

の両方を併せ持つ優れた活性酸素除去機能を有する抽出物であることがわかる。

〔0164〕<メラニン生成抑制機能の評価方法>6穴プレートに培地を2 ml／well取り、B-16メラノーマ細胞を所定量播種し、37℃、二酸化炭素濃度5%にて静置、培養する。翌日、所定濃度になるように検体試料（オリーブ各種抽出物）調製液を添加混和し、培養を継続する。培養5日目に培地を交換し、再度検体試料調製液を添加する。翌日、培地を除き、細胞を回収しPBS（リン酸緩衝生理食塩水）で洗浄後、細胞の白色化度により評価した。なお、メラニン生成抑制機能の評価は、検体試料調製液の代わりにアルブチン（ポジティブコントロール）300 μg／mlを用いて同様の操作を行った細胞の白色化度、および、検体試料無添加（コントロール）で同様にして得られた白色化度と比較して、以下の基準で評価した。細胞の白色化度の評価基準

そ、以下の基準で評価した。繊胞の白色化度の評価基準*

	后方 (cm)														
	25	20	50	75	100	150	200	300	400	450	500	600	800	1000	1200
实距例1					-	± 100	± 100	± 100	+	++ 100	++ 100	++ 100	++ 100	++ 21	++ ND.
实距例2					-		± 100	± 100	+	++ 100	++ 100	++ 100	++ 92		ND.
实距例3					-		± 100	± 100	+	++ 100	++ 100	++ 100	++ 30		ND.
实距例4					-		± 100	± 100	+	++ 100	++ 100	++ 100	++ 77		ND.
实距例5					-		± 100	± 100	+	++ 100	++ 100	++ 100	++ 69		ND.
实距例6					-		± 100	± 100	+	++ 100	++ 100	++ 100	++ 29		ND.
实距例7					-		± 100	± 100	+	++ 100	++ 100	++ 100	++ 86	++ 46	ND.
实距例8					-		± 100	± 100	+	++ 100	++ 100	++ 100	++ 81		ND.
实距例9					-		± 100	± 100	+	++ 100	++ 100	++ 100	++ 78		ND.
实距例10					-		± 100	± 100	+	++ 100	++ 100	++ 100	++ 71		ND.
实距例11					-		± 100	± 100	+	++ 100	++ 100	++ 100	++ 60		ND.
实距例12					-		± 100	± 100	+	++ 100	++ 100	++ 100	++ 53		ND.
实距例13					-		± 100	± 100	+	++ 100	++ 100	++ 100	++ 44		ND.
实距例14	-	-	± 100	± 100	+	++ 100	++ 100	++ 100	++ 100	++ 100	++ 100	++ 92	++ 38	ND.	
实距例15	-	-	± 100	± 100	+	++ 100	++ 100	++ 100	++ 100	++ 100	++ 100	++ 86	++ 36	ND.	
实距例16	-	-	± 100	± 100	+	++ 100	++ 100	++ 100	++ 100	++ 100	++ 100	++ 80	++ 35	ND.	
实距例17	-	-	± 100	± 100	+	++ 100	++ 100	++ 100	++ 100	++ 100	++ 100	++ 78	++ 35	ND.	
实距例18	-	-	± 100	± 100	+	++ 100	++ 100	++ 100	++ 100	++ 100	++ 100	++ 74	++ 34	ND.	
实距例19	-	-	± 100	± 100	+	++ 100	++ 100	++ 100	++ 100	++ 100	++ 100	++ 70	++ 30	ND.	
比校例7							-		-	-	-	-	-		
C/T(后方)输出值(%)							-		-	-	-	-	-		
比校例8	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	
G. リミング/ゲージング(%)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	ND.
比校例9	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	
比校例10	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	
比校例11	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	
N. 1. 比較値と実測値の誤差(%)	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	

N. D. 12細胞生存率が10%以下であることを示す
細胞白色度の基準となるアルブチンの濃度は300ppm
アルブチンがN. D. となる濃度は500ppm

* * [表4]

[0172]

尾崎和：国内版のオリーブの压延業者から種子を販売、配達したもの

〔0173〕表3、4の各実施例から、本発明の抽出物は、天然原料からの単なる抽出物の状態で、優れたメラニン生成抑制機能を有する美白効果の強い美白剤として公知であるアルブチンやコウシ酸と同等以上のメラニン生成抑制機能を有し、さらに、ビタミンC リン酸マグネシウムを大幅に上回る、非常に強いメラニン生成抑制機能を有する。加えて毒性が低いことから、害質メラニン

* は、以下に示す通りである。

++: ポジティブコントロールより自くなつた

+: ポジティブコントロールと同程度に自くなつた

±：ポジティブコントロールより白くならないが、コントロールより白くなつた-：コントロールと同程度

【0165】細胞生存率は、各添加濃度において、前述した<式5>により求められる。

〔0170〕上記方法によってメラニン生成抑制機能を評価した。また、メラニン生成抑制機能指数を前記く式

3>により算出し、同様に、実質メラニン生成抑制機能指数を前記<式6>、メラニン生成抑制機能収量指数を前記<式7>、実質メラニン生成抑制機能収量指数を前記<式8>により算出した。

[0171]

【表3】

	100	100	100	100	100	N.D.	
++	++	++	++	++	++		
100	100	100	100	100	33	N.D.	
++	++	++	++	++			
100	69	22	N.D.				
++	++	++	++	++			
100	95	38	N.D.				
-	-	±	±	+	++		
100	89	100	85	85	80	N.D.	
-	-	-	-	+			
100	100	100	100	100			
+	++	++	++	++			
83	81	66	23	N.D.			

実質メラニン生成抑制機能指数	メラニン生成抑制機能 吸収指數	美白メラニン生成抑制機能 吸収指數
2.4	48.8	118.1
2.0	34.8	69.6
2.0	42.7	63.4
1.8	38.4	87.3
1.6	29.6	51.0
1.5	24.2	72.1
2.4	12.6	14.2
2.4	12.6	20.2
1.6	5.6	12.4
6.0	39.2	78.4
7.2	35.0	64.1
8.0	18.0	38.0
10.0	48.0	48.0
10.0	50.0	50.0
0.7	3.7	7.4
1.2	-	-

指数が、他の天然原料に比べて非常に高い値が得られる。さらに、実施例18、19から、本発明の抽出物は濃縮することで、メラニン生成抑制機能が大幅に向かうこと分かった。実施例からは、水への溶解特性を利用し、水に容易に溶解する部分を除去する方法で濃縮された本発明の抽出物は、アルブチンの10倍という、非常に強い皮膚に対するメラニン生成抑制機能が得られている。

【0174】<腫瘍細胞増殖抑制・死滅機能の評価方法>腫瘍細胞増殖抑制・死滅試験は以下の方法で行った。6穴プレートに培地を2ml/well取り、B-16メラノーマ細胞を所定量播種し、37°C、二酸化炭素濃度5%にて静置、培養した。翌日、所定濃度になる様に検体試料調製液を添加混和し、培養を継続した。培養5日目に培地を交換し、再度検体調製液を添加した。翌日、培地を除き、細胞を回収しPBS(リン酸緩衝生理食塩水)で洗浄後、生存細胞数をカウントし、細胞増殖率を下記式12から算出した。この細胞増殖率から腫瘍細胞増殖抑制・死滅機能の評価を行った。検体試料無添加での細胞増殖率(コントロール)と比較した。

【0175】

【数12】

$$<\text{式}12> \text{細胞増殖率} (\%) = (L \div M) \times 100$$

L: 各検体添加時の生存細胞数

M: 検体無添加時の細胞数

【0176】本発明の抽出物を濃縮精製した実施例20の抽出物を、表7の記載の各濃度になるように添加し、細胞増殖率を算出して評価を行った。また、比較としてオレアノール酸を添加した場合の細胞増殖率を同様に算出し評価を行った。結果を下表5に示す。

【0177】

【表5】

	濃度 (ppm)									
	20	25	30	35	40	45	50	60	70	80
実施例20分画精製物	68	49	25	6	0	0				
オレアノール酸	100	100	100	100	100	100	94	84	75	69

【0178】表5から、本発明の抽出物を濃縮精製した実施例20の分画精製物では腫瘍細胞増殖抑制機能が非常に強いことが分かった。また、発癌プロモーター抑制活性を有するオレアノール酸と比較しても極めて優れた

腫瘍細胞増殖抑制機能を有することが分かった。また、腫瘍細胞増殖抑制機能を発揮する濃度の2倍程度では、非常に強い腫瘍細胞死滅機能を発揮した。これは、オレアノール酸には見られない機能であった。これにより、本発明の抽出物は非常に優れた腫瘍細胞増殖抑制・死滅機能を有することが明らかになった。

【0179】次に、本発明の抽出物を、実際に製品や動物、ヒトに適用した場合の効果について、その効果を評

価した例を挙げる。すなわち、抗酸化効果、美肌効果、腫瘍増殖・転移抑制効果について、それぞれの評価方法および評価結果を示す。

【0180】まず、抗酸化効果については、実際の食品に配合した時の酸化防止効果と、実際に動物に摂取させた時の生体内抗酸化効果について評価方法および評価結果を示す。

【0181】実施例21 クッキーを用いた酸化防止効果の評価

10 下記配合にて原料を混合し、1個あたり10gになるよう分割し、180°Cで15分焼き、クッキーを製造した。なお、対照には、本抽出物を配合せずにせずに製造した。

(原料)	(配合量)
(1) マーガリン	70g
(2) 砂糖	40g
(3) 食塩	0.7g
(4) 全卵	20g
(5) 莓力粉	100g
(6) 実施例17の抽出物	1g

【0182】作製直後のクッキーの一定重量について、常法に則って、ヘキサンにて脂質を抽出しヘキサンを溜去した後、その脂質のPOVを測定したところ、対照のクッキーのPOVは2.1、本発明の抽出物を配合したクッキーのPOVは2.3であった。これらのクッキーを60°C、暗所で18日間保存後、同様にしてPOVの測定を行なったところ、対照のクッキーのPOVは3.1.7にまで上昇していたのに対し、本発明の抽出物を配合したクッキーのPOVは7.5であった。また、同様にして得られたクッキーを、60°C、暗所で18日間保存後、試食した。その結果、対照のクッキーはかなりの酸化劣化臭を有していたのに対し、本発明の抽出物を配合したクッキーは、保存後も良好な風味を有していた。

【0183】この結果から、本発明の抽出物は酸化防止効果を有し、製品等の保存安定性を向上させる効果を有することがわかった。

【0184】各実施例で得られたオリーブ抽出物を、実際に動物に摂取させた時の生体内抗酸化効果について、40 その評価方法および評価結果を示す。

【0185】実施例22 ラットを用いた生体内抗酸化効果の評価

6週齢のウィスター系雄ラット(日本エスエルシー)7匹を1試験区とし、各試験区用の粉末精製飼料を、4週間水とともに自由摂取させた。各試験区用飼料は、下表6の飼料組成の通りに作製した。飼料成分の酸化劣化を防ぐために、飼料は2日に1回交換した。試験食投与4週間目の午前9時より絶食させ、午後2時より各ラットの肝臓を採取した。肝臓中の抗酸化能を下記AOA法を用いて測定し、検体の各オリーブ抽出物の生体内抗酸化

作用を評価した。

[0186]

* [表6] 飼料組成 (%)

*

	第1群	第2群	第3群	第4群	第5群	第6群	第7群
コーンスターク	52.95	52.95	52.95	52.95	52.95	52.95	52.95
カゼイン	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00
グラニュー糖	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
精製ダイズ油	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00
セルロース	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
ミネラル混合(AIN-83G)	3.50	3.50	3.50	3.50	3.50	3.50	3.50
ビタミン混合(AIN-83G)※	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
L-シスチン	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
重曹・石酸コリン	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
実施例1のオリーブ抽出物		1.00	0.10	0.01			
実施例14のオリーブ抽出物					0.10		
実施例16のオリーブ抽出物						0.10	
実施例17のオリーブ抽出物							0.10

※：トコフェロールを除いたもの。

[0187] <AOA法（脂質過酸化抑制率の測定法）>基質として、牛の脳のリン酸緩衝液の摩碎物を用意する。これに、後述する方法で採取した肝臓の摩碎物を添加し、37℃で1時間保持して、脂質の酸化を進行させる。この反応液の除タンパク上清にTBA（チオバルビツール酸）溶液を添加して攪拌し、95℃で、15分間保持する。この反応液の吸光度を分光光度計により測定※20

※する。吸光度の値の大小と、過酸化脂質濃度の大小は相関している。検体（各オリーブ抽出物）添加群での吸光度と、対照群の吸光度とを比較し、検体（各オリーブ抽出物）の脂質過酸化抑制率（%）を求める。

[0188] 上記方法にて、生体内抗酸化効果を評価した。この結果を表7に示す。

[0189]

[表7] 肝臓脂質過酸化抑制率

	肝臓脂質過酸化抑制率(%)
1. 無添加(対照)群	0
2. 実施例1のオリーブ抽出物1%添加群	85.2
3. 実施例1のオリーブ抽出物0.1%添加群	64.7
4. 実施例1のオリーブ抽出物0.01%添加群	41.5
5. 実施例14のオリーブ抽出物0.1%添加群	53.7
6. 実施例16のオリーブ抽出物0.1%添加群	55.1
7. 実施例17のオリーブ抽出物0.1添加群	61.3

[0190] 表7から、本抽出物は、経口摂取により、生体内においてその抗酸化効果を発揮し、生体内酸化の結果生じる過酸化脂質の生成を抑制することが確認された。また、この効果は含量依存的であることから、求められる効果に応じて、含量を増減すればよいことも分かった。

[0191] 次に、美肌効果については、実際に本発明の抽出物を配合したクリーム、化粧水、乳液等の様々な皮膚外用剤等を処方し、これを女性バナルに適用した時

の評価を行った。特に、皮膚に対する抗老化効果および美白効果について評価を行った。これらの評価方法および評価結果を下記に示す。

30 [0192] 実施例23 クリーム：各実施例で得た抽出物を用いて、表8に示す組成及び下記製法でクリームを調製し、その皮膚に対する抗老化効果を調べた。この結果も併せて表8に示す。

[0193]

[表8]

成分(%)	本発明						比較	
	1	2	3	4	5	6	1	2
(1)ミツロウ	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
(2)セタノール	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
(3)還元ラノリン	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
(4)スクワラン	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0
(5)グリセリンモノステアレート	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
(6)乳油型モノステアリン酸グリセリン	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
(7)トリキシザレンリルピタンモニオリジンエステ(208.0.)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
(8)実施例1の抽出物	0.25							
(9)実施例3の抽出物	0.25							
(10)実施例5の抽出物		0.25						
(11)実施例13の抽出物			0.25					
(12)実施例14の抽出物				0.25				
(13)実施例15の抽出物					0.25			
(14)比較例1の抽出物						0.25		
(15)防腐剤	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
(16)香料	適量							
(17)精製水	残量							
抗老化効果	有効	11	13	10	9	9	8	4
	やや有効	4	2	5	5	5	4	3
	無効	0	0	0	1	1	7	12

【0194】(製法)

A. 成分(1)～(6)及び(15)を混合し、加熱して70°Cに保つ。
 B. 成分(7)～(14)及び(17)を混合し、加熱して70°Cに保つ。
 C. AにBを加え、混合する。
 D. 冷却しながら(16)を加えてクリームを得た。 *

(評価基準)

<評価> <内容>

有効	肌にはり、つやが付与された、シワ・たるみが改善された
やや有効	肌にはり、つやがやや付与された、シワ・たるみがやや改善された

無効 使用前と変化なし

【0197】表8の結果に示される如く、本発明の抽出物を配合した1～6のクリームは、これらを皮膚に適用することにより、肌にはり、つやが付与され、シワ・たるみを改善することができ、美しい肌とすることが明らかとなった。これにより、本発明の抽出物を配合した1～6のクリームは優れた抗老化効果を有することが明らかになった。

* 【0195】(試験方法)被験クリーム1品につき20

～54才の女性15名をパネルとし、毎日朝と夜の20回、8週間にわたって洗顔後に被験クリームの適量を顔面に塗布した。塗布による皮膚の抗老化効果を以下の基準によって評価した。

【0196】

【0198】実施例24 クリーム：各実施例で得た抽出物を用いて、表9に示す組成及び下記製法でクリームを調製し、その美白効果を調べた。この結果も併せて表9に示す。

【0199】

【表9】

51

成分(%)	本発明品					比較品				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
(1)ミツロウ	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
(2)セタノール	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
(3)還元テノリン	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
(4)スクワラン	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0
(5)ダマセセンノステアレート	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
(6)複合型モノステアリン酸*	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
(7)ガリコシエチレンジルビタノラ ウラ酸イソチ(10E.O.)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
(8)ビタミンCリン酸*						0.05				
(9)コウジ酸						0.05				
(10)アルブチン						0.05				
(11)実施例1の抽出物	0.05									
(12)実施例13の抽出物	0.05									
(13)実施例14の抽出物		0.05								
(14)実施例16の抽出物			0.05							
(15)実施例19の抽出物				0.05						
(16)比較例1の抽出物							0.05			
(17)防腐剤	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2
(18)香料	適量									
(19)精製水	残量									
美白効果	有効	8	12	12	15	5	9	9	4	0
	やや有効	4	5	3	1	7	4	3	6	1
	無効	2	2	0	0	1	2	3	5	14

【0200】(製法)

A. 成分(1)～(6)及び(17)を混合し、加熱して70°Cに保つ。
 B. 成分(7)～(16)及び(19)を混合し、加熱して70°Cに保つ。
 C. AにBを加え、混合する。
 D. 冷却しながら(16)を加えてクリームを得た。 *

(評価基準)

<評価>		<内容>							
有効	肌の色黒、シミ、ソバカス、くすみが目立たなくなった。								
やや有効	肌の色黒、シミ、ソバカス、くすみがあまり目立たなくなった								

無効 使用前と変化なし。

【0203】表9の結果に示される如く、本発明の抽出物を配合した1～5のクリームは、これらを皮膚に適用することにより、肌の「くすみ」等の発生の防止、改善することができ、美しい肌とすることが明らかとなつた。これにより、本発明の抽出物を配合した1～5のクリームは、アルブチン、コウジ酸、ビタミンCリン酸マグネシウム等を配合した場合と比較しても、優れた美白効果を有することが明らかになった。

【0204】次に、抗腫瘍効果については、実際に動物に投与した場合の腫瘍増殖・転移抑制効果の評価方法および評価結果を下記に示す。

【0205】<悪性黒色腫増殖・転移抑制試験>悪性黒色腫増殖・転移抑制試験は以下の方法で行った。ウィスター系雌ラット(6週齢、平均体重160g)をAIN-93組成の粉末調製飼料で1週間予備飼育した後、平均体重が均等になるように5群(1群8匹)に分け、あらかじめ調製してあったB16メラノーマ細胞の懸濁液を、各ラットに静脈注射した。引き続きAIN-93組成の粉末調製飼料で飼育を行い、B16メラノーマ細胞

* 【0201】(試験方法)被験クリーム1品につき27名54才の女性15名をパネルとし、毎日朝と夜の2回、12週間にわたって洗顔後に被験クリームの適量を顔面に塗布した。塗布による美白効果を以下の基準によって評価した。

【0202】

注射後2日目から1日おきに、所定濃度のオリーブ抽出物(分画精製した抽出物)またはオレアノール酸を溶解させた綿実油を、注射により腹空内投与あるいはゾンデを用いて経口投与した。なお、コントロール群には綿実油のみを投与した。B16メラノーマ細胞注射後15日目に、肺に転移した癌病巣を摘出しその総体積から増殖抑制率を、肺に転移した癌病巣数から転移抑制率を、それぞれ下記<式13>および<式14>から算出した。

40 この増殖抑制率および転移抑制率から腫瘍増殖・転移抑制効果の評価を行った。

【0206】

$$[数13] <式13> \text{ 増殖抑制率} (\%) = (O - N) / O \times 100$$

N: 各群における一個体あたり総癌体積の平均

O: コントロール群における一個体あたり総癌体積の平均

【0207】

$$[数14] <式14> \text{ 転移抑制率} (\%) = (Q - P) / Q \times 100$$

50

P: 各群における一個体あたり転移癌病巣数平均
Q: コントロール群における一個体あたり転移癌病巣数平均

【0208】実施例25

綿実油をコントロールとして、本発明の抽出物を濃縮精製した実施例20の抽出物について、表10に記載の投*

投与物質	投与量 (mg/体重kg)	投与方法	増殖抑制率 (%)	転移抑制率 (%)
綿実油のみ(コントロール)	—	経口投与	0	0
実施例20分西精製物	100	経口投与	71.2	62.5
実施例20分西精製物	100	腹腔内投与	73.9	68.5
実施例20分西精製物	200	経口投与	85.5	79.9
オレアノール酸	300	経口投与	9.9	9.5

【0210】表10から明らかなように、本発明の抽出物を濃縮精製した実施例20の抽出物は、腹腔内投与及び経口投与のいずれにおいても、コントロール群と比較して、有意に ($P < 0.05$) 肺への癌の増殖および転移を抑制した。オレアノール酸の投与では顕著な効果が見られなかった。この結果から、本発明の抽出物が非常に有効な腫瘍増殖・転移抑制効果を有することが明らかとなった。

【0211】

【発明の効果】本発明によれば、オリーブ植物等から強力なスーパーオキシド消去活性またはヒドロキシラジカル消去活性等の活性酸素除去機能、メラニン生成抑制機能、腫瘍細胞増殖抑制・死滅機能等を有する抽出物を得ることができる。また、前記の1次的機能を有する本発明の抽出物を人体、その他飲食物、化粧料、医薬品、農業

* 与量、投与方法により増殖抑制率、転移抑制率の評価を行った。また、比較としてオレアノール酸を添加した場合の増殖抑制率、転移抑制率の評価を同様に行った。評価結果を下表10に示す。

【0209】

【表10】 腫瘍増殖・転移抑制率

※ 薬、飼料等の分野の製品に使用することで、酸化防止効果や生体内抗酸化効果等の抗酸化効果、皮膚の抗老化効果や美白効果等の美肌効果、腫瘍細胞増殖・転移抑制効果等の抗腫瘍効果を發揮する。つまり、生体内抗酸化効果を有する健康食品や、美肌効果に優れた皮膚外用剤や、抗腫瘍効果を有する医薬品等を得ることがえき、更にはそれぞれの製品の保存性を向上させることができ。また、本発明によれば、活性酸素除去機能、メラニン生成抑制機能、腫瘍細胞増殖抑制・死滅機能等を有する抽出物を、収率よく得ることができますため、単位原料あたりに得ることができる各機能の総量(総指數)が非常に多く、また、オリーブの粕等を原料として得ることができますため、安定的、かつ、低いコストで、優れた活性酸素除去機能、メラニン生成抑制機能、腫瘍細胞増殖抑制・死滅機能等を有する成分を得ることができる。

フロントページの続き

(51) Int.CI.*

A 61 P 39/06

識別記号

F I

A 61 P 39/06

テーマコード(参考)